

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**FUNDACIÓN DE INVESTIGACIÓN HOSPITAL CLÍNICO DE
VALENCIA - INCLIVA**

Unidad de Genómica y Diagnóstico Genético

Grupo de Investigación de Estudio de Riesgo Cardiometabólico y Renal

**PERFIL DE MICRO ARNs EXOSOMALES
ASOCIADOS A DAÑO GLOMERULAR EN PACIENTES
HIPERTENSOS CON MICROALBUMINURIA**

Tesis doctoral

Presentada por:

Javier Pérez Hernández

Dirigida por:

Raquel Cortés Vergaz

Felipe Javier Chaves Martínez

Josep Redón i Mas

València, Noviembre 2017



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

INCLIVA | VLC
Instituto de Investigación Sanitaria

Dña. **RAQUEL CORTÉS VERGAZ**, doctora en Ciencias Biológicas, investigadora de la Unidad de Genómica y Diagnóstico Genético y del Grupo de Investigación de Estudio de Riesgo Cardiometabólico y Renal de la Fundación H. Clínico de Valencia-INCLIVA; D. **FELIPE JAVIER CHAVES MARTÍNEZ**, doctor en Ciencias Biológicas, investigador jefe y coordinador de la Unidad de Genómica y Diagnóstico Genético de la Fundación H. Clínico de Valencia-INCLIVA y **D. JOSEP REDON I MAS**, doctor en Medicina, jefe de servicio de Medicina Interna del H. Clínico y coordinador del Grupo de Investigación de Estudio de Riesgo Cardiometabólico y Renal de la Fundación H. Clínico de Valencia-INCLIVA.

CERTIFICAN:

Que D. **JAVIER PÉREZ HERNÁNDEZ**, Licenciado en Bioquímica y Ciencias Biológicas por la Universitat de València, ha realizado bajo nuestra dirección en la Fundación de Investigación H. Clínico de Valencia - INCLIVA, en la Unidad de Genómica y Diagnóstico Genético y el Grupo de Investigación de Estudio de Riesgo Cardiometabólico y Renal, la Tesis Doctoral titulada “**PERFIL DE MICRO ARNs EXOSOMALES ASOCIADOS A DAÑO GLOMERULAR EN PACIENTES HIPERTENSOS CON MICROALBUMINURIA**”.

Y para que así conste, expedimos el presente certificado en Valencia, a 20 de Noviembre de 2017.

Fdo.

Raquel Cortés Vergaz

F. Javier Chaves Martínez

Josep Redon i Mas

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto *“Podocitos y sus componentes como biomarcadores de lesión en hipertensión arterial, diabetes y obesidad”* (Intrasalud PI12/02615), Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias, cuyo investigador principal es el Dr. Josep Redon i Mas.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar agradeciendo a mis directores de tesis por su confianza y contribución en mi formación científica. Al Dr. Josep Redon, jefe del servicio de Medicina Interna del H. Clínico y a todo su equipo, por coordinar el proyecto y conseguir las muestras de este trabajo así como de otros estudios que hemos desarrollado en estos años y por permitirme realizar una estancia predoctoral y asistir a congresos internacionales. Al Dr. Javier Chaves, coordinador de la Unidad de Genómica y Diagnóstico Genético de INCLIVA, por darme la oportunidad de unirme a tu unidad hace ya más de 5 años, por confiar en mí y por tu ayuda en mi formación científico-técnica durante el transcurso de la tesis. Y, especialmente, a la Dra. Raquel Cortés, directora principal de este trabajo. Gracias por ayudarme con todas las correcciones que han mejorado sensiblemente la calidad de esta tesis, por exigirme durante estos años, también por escucharme y dejarme participar del diseño de experimentos. Creo que hemos formado un buen equipo en el Labo2 que se complementa muy bien y espero que esta nueva línea de investigación que has comenzado tenga continuidad y estabilidad en los próximos años, para así poder seguir demostrando tus grandes capacidades como investigadora. Eso sí, *Rakhaleesi* nunca tendrá otro dragón igual como el primero eh! También quiero destacar y agradecer el excelente trabajo de Daniel Pérez y Ángela Riffo, claves a la hora de realizar el análisis bioinformático de los datos y el análisis de enriquecimiento de miARNs con las rutas de KEGG, respectivamente.

Me gustaría continuar agradeciendo a todos los que han sido mis compañeros durante todos estos años en la UGDG. Primero, mil gracias por aguantarme estos últimos meses de experimentos finales, estrés y agobios con la escritura. Espero que os quedéis con mi versión simpática y *bocachanclera*, con el Javi que se podía quejar por tonterías sin sentido como *timers* y campanas encendidas! Ahora en serio, gracias a todos por formar una pequeña familia, por todos los buenos momentos (esas comidas de Navidad que se alargaban en cenas y cervezas infinitas) y por haberme enseñado las bases del funcionamiento de un labo de genética desde cero. Somos muchos, pero quiero tener un recuerdo especial para Victoria y Cris, *alma mater* de la UGDG, porque cuando abro la puerta del Labo23 aún pienso que van a estar ahí, armando jaleo o echándole la bronca a alguna agaporni empanada. Joder, esto no es lo mismo sin vosotras! Para Vero, la Jefa, a la que espero que le vaya muy bien su nueva aventura porque se lo merece y tiene que

pensar más en ella. A Tani, por su sentido del humor y estar siempre al pie del cañón. A Loles, aquella muchacha murciana que fue *mi becaria* (me encanta decirlo!) durante un tiempo y que ahora se ha convertido en una pieza, tanto profesional como personalmente, indispensable para la unidad y la empresa. A la conexión Molinicos-Bogotá, cuyo paso breve pero intenso nos ha dejado huella a todos. Que buenos cafés y comidas hemos echado con vosotras, chicas! Por último, a las exomitas Vane e Inma. *Gràcies per la teua ajuda des del primer dia, amiga. Per tants cafenets i consells, per convidar-me a Yale i per aguantar-me durant els moments més estressants! Espere que sigues feliç, tries el camí que tries, perquè t'ho mereixes.*

También me querría acordar de otros colegas de INCLIVA, como Miguel y Álex, de la unidad de Bioinformática; Carlos Bueno y el resto de *LINCES*, que nos han echado una mano con los aparatos y gracias también a las chicas POG, por esa dispensa con todos los reactivos del mundo y hacerme compañía en este largo y oscuro pasillo por las tardes!

No me olvido de mi estancia en París en donde tan bien me trataron, un gran *Merci* a la Dra. Boulanger y el Dr. Loyer por aceptarme en el PARCC, enseñarme y hacerme partícipe de su laboratorio como uno más. Gracias a todo *l'équipe 1*, en especial a Cécile y Marion por su ayuda con las muestras y los protocolos. Al mini team-EV con Mike y Darine, compañeros “guiris” de fatigas y largas centrifugaciones. También a la gente de *l'équipe 5* y *6* como Andreas y José. Da gusto encontrarse con españoles así por el mundo. Gracias por esos meses y por la *Retraite*, eso sí, nunca más se me ocurrirá mezclar Chardonnay y Calvados en una misma noche!

Una de las cosas que voy a recordar con más cariño de estos años va a ser la organización del Congreso de Jóvenes Investigadores en Biomedicina. He aprendido muchísimo con vostr@s, de verdad. Tenemos que estar orgullosos del trabajo que hemos llevado a cabo estos años y, aunque algunos ya habéis volado del nido, espero no perder el contacto. Por esas cenas y también por esas reuniones interminables (a ver, chicos, centrémonos!). Estoy seguro de que dentro de unos años se hablará de “Generación Conbiopreval” porque tenéis mucho talento y entusiasmo!

Por supuesto, no me puedo olvidar de los orígenes. De aquel chico que salió de su pueblo para ir a estudiar a València y acabó formándose académica y personalmente allí. Todo empezó en aquellas clases de Biología en la “maravillosa” Burjassot, en su reprografía conocí a grandes amigos y personas con los que aún guardo relación.

Especialmente me quiero acordar de Raquel, una de las mejores personas que conozco, de Jero y de Fer, grandes amigos vaquilleros que siempre han estado ahí pese a la distancia. Aquello continuó en Bioquímica. Fueron dos años duros académicamente pero fantásticos a nivel personal con un gran grupo. En Aguacates y el Bar de los montaditos gratis debería haber una foto nuestra...bueno casi mejor que no! De todos los bioquímicos, quiero hacer mención especial a Silvia, gran amiga que es un ejemplo de crecimiento y superación, del talento que hay en este país y que muchas veces se tiene que ir fuera para demostrarlo. Estoy seguro que de que continuarás creciendo y aprendiendo, *Froilen*. *I, per supost, mil gràcies a Carles per aquestos anys. Sempre has estat ahí, per a una birra i llarga conversa, per a una exposició o peli, per a ajudar-me en qualsevol cosa. M'alegre moltíssim de que hages trobat el teu camí personal i professionalment, t'ho mereixes més que ningú, amic.* Tampoco me quiero olvidar de la gente del máster, sobre todo de Víctor y Alberto, dos investigadores motivadísimos y talentosos que no tienen techo y a los que les irá bien seguro.

En el ámbito más personal, me gustaría comenzar por darte las gracias a ti, Jeanne. Por aparecer en mi vida en aquellas calles empedradas de York. Por haber tenido la paciencia de aguantar todos estos años y ser mi apoyo en los malos momentos. Te prometo que a mí también me dijeron que sería más corto y más fácil. Sabes que te quiero un montón, que eres *ma petite soleil* y que quiero estar a tu lado para comenzar una nueva etapa juntos. Lo mejor está por llegar, *bella*, y sabes que nunca me voy a cansar de tus historias locas que van desde la técnica del esquí hasta iglesias enterradas en medio de Etiopía...

Por último y más importante, dar las GRACIAS de corazón a mi familia. A mis tíos Juanvi, Sanín y Mari por su cariño y por su interés en mi trabajo y mis aventuras. A mi abuelo Juan, por aquellos largos días de verano contándome historias en la tienda, la cooperativa y los viajes a la playa en la C15. Aunque ya no abras la puerta sonriente, ni suene tu clásico “hombre, catedràtic, como estás?”, siempre lo recordaré. A mi abuela Julia, por todo tu cariño y por preocuparte de mí en estos años. Siempre solía bromear con que media carrera se la debía a tus “tuppers” de legumbres y caldos. Gracias también por haberme ayudado en cada estancia en el extranjero con aquellos billetes enrollados que me metías en el bolsillo sin dejarme ni rechistar. A mis padres, Tere y Juanjo, y a mi hermano Raúl, por los valores que me han transmitido y por su apoyo y ayuda para que pudiera venir a estudiar a Valencia, irme de Erasmus, de Leonardo...por todo. Hemos

pasado momentos muy duros pero los hemos superado juntos y lo volveremos a hacer en el futuro si estamos unidos. Por último, quiero hacer mención especial a mi madre, la mejor persona que conozco y una de las más fuertes. Mamá, aunque los “surcos del azar”, que decía Machado, no han sido los más fáciles para ti, siempre has estado ahí para nosotros y nosotros vamos a estar siempre a tu lado cuando lo necesites.

ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Ago2	Argonauta-2
ANGPT	Angiopoyetinas
AQ1	Acuaporina 1
ARA II	Antagonistas del receptor de angiotensina II
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNp	Ácido ribonucleico pequeño
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
Ca	Calcio
CD2AP	Del inglés, <i>CD2-associated protein</i>
CEg	Célula endotelial glomerular
CPM	Del inglés, <i>counts per million</i>
Ct	Del inglés, <i>cycle threshold</i>
CTGF	Del inglés, <i>connective tissue growth factor</i>
DE	Diferencialmente expresado
dNTP	Del inglés, <i>deoxynucleotide</i>
DTT	Ditiotreitol
EGF	Del inglés, <i>epidermal growth factor</i>
ELISA	Del inglés, <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EUA	Excreción urinaria de albúmina
EXO	Exosomas
FC	Del inglés, <i>fold-change</i>
FGR	Filtrado glomerular renal
FSGS	Del inglés, <i>focal segmental glomerulosclerosis</i>
GBM	Del inglés, <i>glomerular basement membrane</i>
GC	Gasto cardíaco
GM-130	Del inglés, <i>Golgi matrix 130</i>

GSEA	Del inglés, <i>gene set enrichment analysis</i>
GTP	Guanosín trifosfato
HDL	Del inglés, <i>high density lipoprotein</i>
HSP	Del inglés, <i>heat shock proteins</i>
HTA	Hipertensión arterial esencial
IMC	Índice de masa corporal
IGF	Del inglés, <i>insuline-like growth factor</i>
ISEV	Del inglés, <i>international society for extracellular vesicles</i>
KEGG	Del inglés, <i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
LDL	Del inglés, <i>light density lipoprotein</i>
VLDL	Del inglés, <i>very light density lipoprotein</i>
MALB	Microalbuminuria
MAPK	Del inglés, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	Matriz extracelular
MHC	Del inglés, <i>major histocompatibility complex</i>
miARN	Micro ARN
MPe	Micropartículas endoteliales
miR	Micro ARN
MV	Microvesículas
ND	Nefropatía diabética
NGS	Del inglés, <i>next-generation sequencing</i>
NTA	Del inglés, <i>nanoparticle tracking analysis</i>
OLC	Orina libre de células
OMS	Organización mundial de la salud
ORA	Del inglés, <i>over-representation analysis</i>
PBS	Del inglés, <i>phosphate-buffered saline</i>
PCu	Pellet celular urinario
PDGF-β	Del inglés, <i>platelet-derived growth factor β</i>
PDX	Podocalixina
RISC	Del inglés, <i>RNA-induced silencing complex</i>
ROC	Del inglés, <i>receiver operating characteristic</i>
RP	Resistencia periférica

RT	Retrotranscripción
RT-qPCR	Del inglés, <i>real time quantitative polymerase chain reaction</i>
SD	Del inglés, <i>slit diaphragm</i>
Sn	Sobrenadante
SNP	Del inglés, <i>single nucleotid polymorphism</i>
TBS	Del inglés, <i>tris-buffered saline</i>
TG	Triglicéridos
THP	Del inglés, <i>tamm-horsfall protein</i>
TGF-β	Del inglés, <i>transforming growth factor β</i>
TSG101	Del inglés, <i>tumour susceptibility gene 101</i>
TRPC6	Del inglés, <i>transient receptor potential cation channel 6</i>
TRPS	Del inglés, <i>tunable resistive pulse sensing</i>
UTR	Del inglés, <i>untranslated regions</i>
VE	Vesículas extracelulares
VEGF	Del inglés, <i>vascular endothelial growth factor</i>
WT-1	Del inglés, <i>wilm's tumour-1</i>

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. Hipertensión arterial.....	5
1.1. Definición, clasificación y epidemiología.....	5
1.2. Fisiopatología de la hipertensión arterial.....	7
1.3. Hipertensión arterial, riesgo cardiovascular y renal.....	9
2. Daño renal en la hipertensión arterial	11
2.1. Marcadores clínicos clásicos: excreción urinaria de albúmina.....	11
2.2. Nuevos marcadores de lesión glomerular: podocitos y sus componentes.....	13
2.2.1. Estructura y función	13
2.2.2. Daño podocitario y pérdida de podocitos.....	15
2.3. Comunicación intercelular en el glomérulo renal: <i>Integrative Glomerular Barrier Complex</i>	17
3. Micro ARNs.....	21
3.1. Definición	21
3.2. Biogénesis y regulación epigenética	21
3.3. Micro ARNs circulantes como biomarcadores	23
3.4. Papel de los micro ARNs en la hipertensión y microalbuminuria	25
4. Vesículas extracelulares	28
4.1. Origen, características biológicas y tipos de vesículas.....	28
4.2. Comunicación intercelular mediada por vesículas extracelulares....	30
4.3. Transporte y transferencia selectiva de micro ARNs mediante vesículas extracelulares.....	31
4.4. Vesículas extracelulares en la hipertensión y microalbuminuria	32
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. Grupos clínicos de estudio	41
1.1. Población de estudio	41

1.2. Población complementaria	42
2. Obtención de las muestras	42
2.1. Urinarias	42
2.2. Sanguíneas	42
3. Cuantificación de los niveles de ARN mensajero en el sedimento urinario de los pacientes	43
3.1. Extracción de ARN total	43
3.2. Síntesis de ADN complementario	43
3.3. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	44
4. Cuantificación de los niveles proteicos en el sedimento urinario de los pacientes	47
4.1. Extracción y determinación de la cantidad de proteínas del sedimento urinario y vesículas extracelulares	47
4.2. Electroforesis, transferencia e inmunodetección	47
5. Aislamiento de vesículas extracelulares	49
5.1. Aislamiento de vesículas extracelulares en orina	49
5.2. Aislamiento de vesículas extracelulares en plasma	50
6. Caracterización de vesículas extracelulares	51
6.1. Estudio de microscopía electrónica de transmisión	51
6.2. Análisis proteico mediante <i>western blot</i>	52
6.3. Perfil de tamaños y cuantificación mediante Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS)	53
7. Análisis de micro ARNs presentes en las vesículas extracelulares urinarias	54
7.1. Extracción de ARN total	54
7.2. Control de normalización: <i>spike-in</i> sintético cel-miR-39	55
7.3. Síntesis de ADN complementario	55
7.4. Cuantificación de micro ARNs mediante PCR cuantitativa en tiempo real y sondas TaqMan	56
7.5. Normalización de resultados usando spike-in cel-miR-39	57

8. Secuenciación masiva de micro ARNs presentes en exosomas y plasma	58
8.1. Preparación de librerías de ARN pequeños	59
8.1.1. Ligación de los adaptadores 3' y 5'	59
8.1.2. Retrotranscripción a ADN complementario	60
8.1.3. Amplificación del ADN complementario	60
8.2. Control de calidad de la librería de ARNs pequeños	61
8.3. Purificación en gel y reamplificación de la librería	62
8.4. Concentración y control de calidad de la librería final	64
8.5. Cuantificación de la librería final por PCR cuantitativo y generación de pools	64
8.6. Secuenciación por síntesis utilizando la plataforma HiSeq 2000	64
8.7. Análisis bioinformático.....	66
8.7.1. Control de calidad: <i>FastQC</i>	66
8.7.2. Limpieza de secuencias: <i>Cutadapt</i>	66
8.7.3. Mapeo de las lecturas contra el genoma de referencia: <i>Bowtie2</i>	66
8.7.4. Recuento de lecturas: <i>HTSeq</i>	67
8.8. Análisis de la expresión diferencial de miARNs	67
8.9. Análisis de enriquecimiento de miARNs e interacciones con rutas de la base de datos KEGG	68
9. Validación de micro ARNs exosomales	69
9.1. Criterios de selección	69
9.2. Validación de micro ARNs por PCR cuantitativa en tiempo real	69
10. Cuantificación de los niveles de TGF-β Y VEGF en orina	71
11. Análisis estadísticos	72
RESULTADOS	75
1. Características clínicas de las poblaciones de estudio	75
2. Niveles de ARN mensajero y proteínas asociadas a podocitos en el sedimento urinario de pacientes hipertensos. Asociación con la excreción urinaria de albúmina	77

2.1. Niveles de ARN mensajero y proteínas asociadas a podocitos en el sedimento urinario de pacientes hipertensos	77
2.2. Relación de los niveles de ARN mensajero y proteínas asociadas a podocitos en el sedimento urinario con la excreción urinaria de albúmina (EUA)	80
2.3. Curvas ROC de los niveles de ARN mensajero y proteínas asociados a podocitos en el sedimento urinario de pacientes hipertensos.....	82
3. Caracterización de vesículas extracelulares de orina y plasma en pacientes hipertensos	83
3.1. Microscopía electrónica de transmisión	84
3.2. Análisis proteico mediante <i>western blot</i>	85
3.3. Perfil de tamaños y cuantificación mediante TRPS	85
3.3.1. Perfil de tamaños de las vesículas extracelulares de orina y plasma	86
3.3.2. Cuantificación de vesículas extracelulares de orina y plasma....	87
4. Estudio del ARN presente en las vesículas extracelulares urinarias....	88
4.1. Estudio cualitativo del ARN vesicular	88
4.2. Estudio cuantitativo del ARN vesicular	89
5. Optimización de la preparación de librerías de ARN pequeños para secuenciación masiva provenientes de vesículas extracelulares y plasma	91
5.1. Controles de calidad y purificación en gel	91
5.2. Aumento del número de lecturas de micro ARNs y otros ARN pequeños en exosomas	93
6. Perfil de micro ARNs exosomales y plasmáticos asociados a la presencia de microalbuminuria en pacientes hipertensos	96
6.1. Características generales de la secuenciación	96
6.2. Análisis de enriquecimiento de micro ARNs en rutas de la base de datos KEGG	97
7. Validación de micro ARNs exosomales seleccionados	107
7.1. Cuantificación absoluta de miR-26a-5p, miR-222-3p y miR-142-3p ...	108

7.2. Relación del número de copias de miR-26a-5p y la excreción urinaria de albúmina (EUA)	109
7.3. Niveles de TGF- β y VEGF en orina	109
DISCUSIÓN	113
1. Niveles de ARN mensajero y proteínas asociadas a podocitos en el sedimento urinario. Asociación con la excreción urinaria de albumina	114
2. Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares. Estudio del ARN que transportan	116
3. Optimización de la preparación de librerías de ARN pequeños para secuenciación masiva provenientes de vesículas extracelulares y plasma	120
4. Perfil de micro ARNs exosomales y plasmáticos asociados a la microalbuminuria en pacientes hipertensos	123
4.1. Características generales de la secuenciación	123
4.2. Diferencias en los micro ARNs obtenidos según cada fracción de estudio	124
4.3. Procesos biológicos regulados por el perfil de micro ARNs asociados a la presencia de microalbuminuria: implicación biológica de los resultados	126
4.3.1. Regulación del citoesqueleto de actina	126
4.3.2. Regulación de la vía de señalización de calcio	127
4.3.3. Regulación de la matriz extracelular, moléculas de adhesión celular, uniones estrechas, adherentes y focales	128
4.3.4. Regulación de la vía de señalización de TGF- β	129
4.3.5. Regulación de la vía de señalización de VEGF	131
5. Validación de micro ARNs exosomales seleccionados. Relación de miR-26a-5p con TGF- β y albuminuria	132
5.1. Descenso en los niveles de miR-26a-5p en exosomas urinarios de pacientes con microalbuminuria. Relación con TGF- β y la excreción urinaria de albúmina (EUA)	133

6. Limitaciones del estudio	136
7. Innovación y perspectivas futuras	137
CONCLUSIONES	141
REFERENCIAS	145
ANEXOS	175

RESUMEN

Introducción: La hipertensión arterial esencial (HTA) es la enfermedad crónica con mayor prevalencia a nivel mundial y constituye uno de los factores de riesgo cardiovascular primario. Pese al control de la presión arterial con antihipertensivos, la aparición de daño renal en la HTA es frecuente y se mide clínicamente como un aumento en la excreción urinaria de albúmina (EUA). Este daño incipiente se define como microalbuminuria, puede progresar a macroalbuminuria y proteinuria durante el curso de la enfermedad y se utiliza como marcador de riesgo cardiovascular y daño orgánico en la hipertensión. Recientemente, las vesículas extracelulares (VE) han sido propuestas como nuevos mediadores de la comunicación intercelular, capaces de transportar ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Los exosomas han sido el tipo de VE más estudiado y su capacidad para transportar micro ARNs (miARNs) de forma selectiva entre células los convierte en candidatos ideales para la identificación de nuevos marcadores y/o mecanismos de lesión. Los miARNs son pequeñas moléculas de ARN no codificante para proteínas que regulan la expresión génica, son muy estables en la circulación y presentan alta especificidad celular y tisular. En el riñón, los miARNs son indispensables para su desarrollo y el mantenimiento de la barrera de filtración. Además, cambios en el perfil de miARNs en diversos biofluidos han sido propuestos como marcadores de inicio y progresión de enfermedad renal.

Hipótesis y Objetivos: La hipótesis de trabajo es que los miARNs de exosomas de orina y plasma pueden estar regulando procesos biológicos clave en la aparición y desarrollo de microalbuminuria en la HTA. Por ello, los principales objetivos de esta tesis han sido: a) aislar, cuantificar y caracterizar distintos tipos de VE en orina y plasma; b) identificar un perfil de miARNs en exosomas de plasma y orina asociados a la presencia de microalbuminuria y determinar los procesos biológicos en los que participan; y c) validar miARNs del perfil asociado a microalbuminuria que puedan ser utilizados como biomarcadores diagnóstico y pronóstico de daño renal incipiente en la HTA.

Material y métodos: Se ha utilizado una cohorte de 52 pacientes con HTA, 28 normoalbuminúricos y 24 microalbuminúricos (MALB). A partir de plasma y orina de cada paciente se aislaron las VE mediante ultracentrifugación, se caracterizaron por tamaño y composición proteica y se procedió a la extracción del ARN total. A continuación, se generaron librerías individuales de ARNs pequeños para secuenciación masiva (NGS) y se analizó la expresión diferencial de miARNs entre los dos grupos de estudio. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento para identificar los

procesos biológicos más regulados por los miARNs que presentaban niveles diferenciados entre grupos y se contrastaron con la base de datos de KEGG. Por último, varios miARNs del perfil se validaron por RT-qPCR.

Resultados: Los resultados obtenidos confirman una correcta separación de VE en orina y plasma, obteniéndose dos poblaciones (exosomas y microvesículas) bien diferenciadas en cuanto a tamaño y composición proteica. Además, se ha demostrado un enriquecimiento de ARNs pequeños en las VE y cómo la presencia de microalbuminuria puede condicionar el perfil de miARNs exosomales. Por su parte, los resultados obtenidos en la secuenciación muestran un perfil de 29 miARNs exosomales cuyos niveles están asociados a la microalbuminuria y que regula un total de 25 procesos biológicos. Entre los más regulados se encontraban el citoesqueleto de actina, diversas vías de señalización celular (calcio, MAPK, p53), factores de crecimiento como TGF- β y VEGF, uniones célula-célula (adherentes, focales y estrechas), así como moléculas de adhesión e interacción con la matriz extracelular. Por último, los niveles de miR-26a-5p en exosomas de orina disminuyeron en el grupo MALB y mostraron una correlación inversa con la EUA.

Conclusiones: Se ha establecido un perfil de 29 miARNs exosomales con niveles alterados en pacientes hipertensos con microalbuminuria que regula numerosos procesos biológicos que pueden desencadenar el inicio y la progresión del daño glomerular, afectando a vías de señalización clave en podocitos, células endoteliales y mesangiales. Además, se ha validado un descenso en los niveles de miR-26a-5p en exosomas de orina del grupo MALB. Este miARN regula vías de señalización y factores de crecimiento fundamentales en el desarrollo y mantenimiento de la barrera de filtración glomerular como TGF- β y VEGF, por lo que se convierte en un potencial biomarcador diagnóstico y pronóstico de lesión glomerular en la HTA. En su conjunto, los resultados de esta tesis demuestran el interés del estudio de micro ARNs transportados por exosomas de orina y plasma para entender los mecanismos de lesión implicados en el desarrollo de daño orgánico durante el curso de la HTA.

INTRODUCCIÓN

1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL

1.1. Definición, clasificación y epidemiología

La hipertensión arterial (HTA) se define como una elevación mantenida de la presión arterial sistólica y/o diastólica por encima de unos valores considerados normales, 140 mm Hg y 90 mm Hg, respectivamente, en pacientes que no estén bajo tratamiento. Estos límites vienen establecidos por organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el *Joint National Committee* (Chobanian et al., 2003).

Para clasificar los diferentes grados de hipertensión, se utilizan las guías de la sociedad europea de HTA que establecen varios niveles de gravedad dentro de los pacientes hipertensos (grados 1, 2 y 3), así como una categoría de presión arterial “normal – alta” (130-139 / 85-89 mm Hg), que equivaldría a la categoría conocida anteriormente como “prehipertensión” (JNCVII, 2003), y que comporta un mayor riesgo cardiovascular (Tabla I1) (Mancia et al., 2014a).

El 90-95 % de los casos de HTA que se observan en la práctica clínica no tienen una etiología o causa conocida y constituyen la llamada HTA esencial o primaria. Por el contrario, existe un pequeño porcentaje de pacientes que desarrollan HTA secundaria debido a ingesta de fármacos, enfermedades renales, hiperaldosteronismo, etc.

Tabla I1. Clasificación de los grupos y valores de presión arterial (mm Hg).

Categoría	PAS		PAD
Óptima	<120	y	<80
Normal	120 – 129	y/o	80 – 84
Normal - Alta	130 - 139	y/o	85 – 89
Hipertensión grado 1	140 – 159	y/o	90 – 99
Hipertensión grado 2	160 – 179	y/o	100 – 109
Hipertensión grado 3	≥180	y/o	≥110
Hipertensión sistólica aislada	≥140	y	<90

PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica. (Adaptado de Mancia et al., 2014a)

La HTA es una de las enfermedades crónicas más prevalentes, aumenta con la edad y depende también de variables como género, origen étnico y nivel socioeconómico. Estudios recientes han establecido una prevalencia a nivel mundial del 31,1% en 2010, con una tendencia global en aumento, sobre todo marcado por el incremento que han sufrido regiones como sudeste asiático y África subsahariana, probablemente relacionadas con la reciente urbanización y consecuente cambio de hábitos como la dieta y el modo de vida (Mills et al., 2016) (Figura I1). En España, la prevalencia es alta con valores medios del 42,6% de la población adulta (50% de los hombres y 37,1% de las mujeres) y se calcula que el 37,4% de los pacientes hipertensos no están diagnosticados (Menéndez et al., 2016).

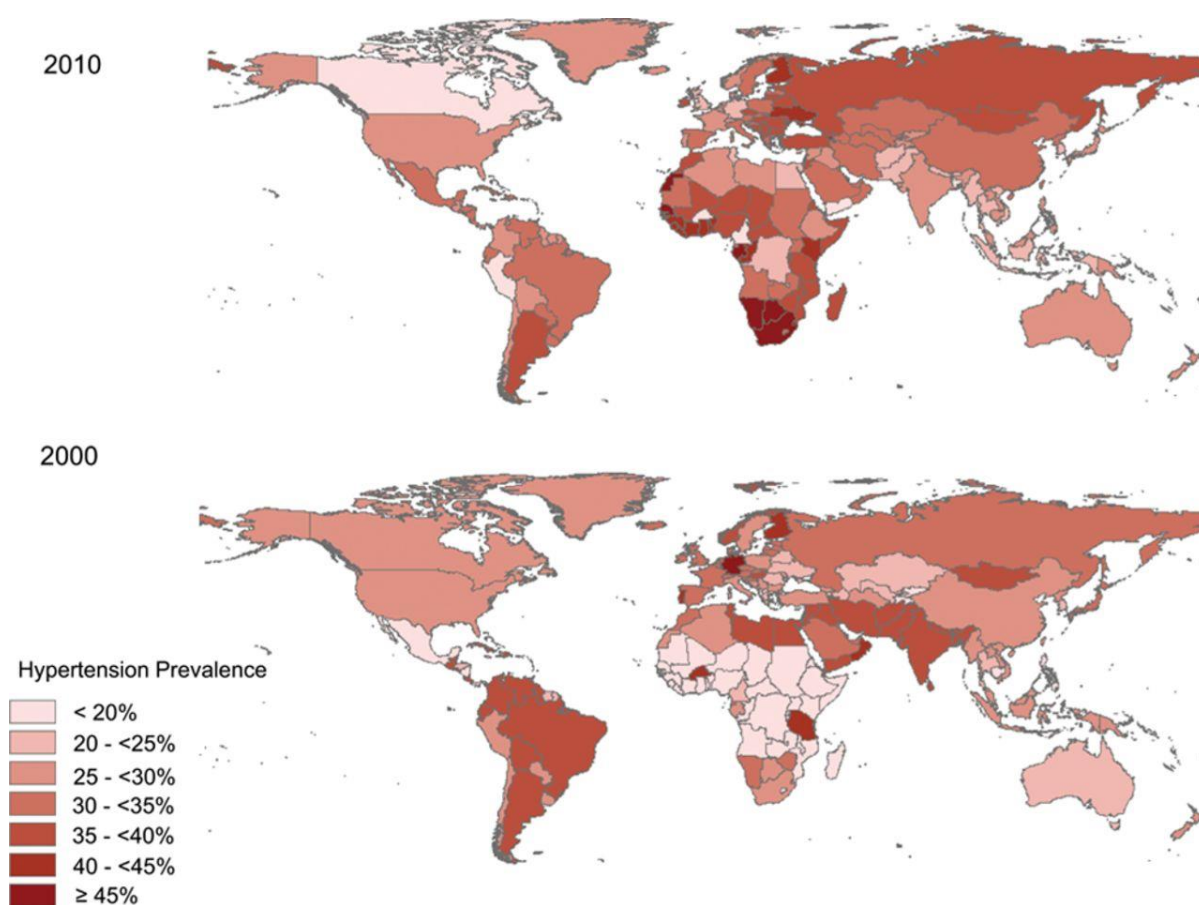


Figura I1. Distribución mundial de la prevalencia de la hipertensión estandarizada por sexo en adultos mayores de 20 años. Se muestra la prevalencia por país en 2010 (arriba) y 2000 (abajo). (Adaptado de *Mills et al., 2016*)

La HTA constituye un factor de riesgo significativo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y representa un importante problema de salud pública. Cálculos llevados a cabo por la Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial han establecido que esta enfermedad supone una de cada cuatro consultas en los servicios de atención primaria y un coste anual de 3.600 millones de euros para el estado (SEH-LELHA, 2015).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que el aumento de la presión arterial se relaciona de manera independiente y gradual con la morbilidad cardiovascular, demostrándose su relación con episodios coronarios, ictus y enfermedad renal en fase terminal (Levy et al., 1996; Lewington et al., 2002). Por tanto, se ha de considerar a la HTA como un factor de riesgo general en la enfermedad cardiovascular que debe ser muy tenido en cuenta en la estratificación del riesgo cardiovascular.

1.2. Fisiopatología de la hipertensión arterial

Los factores primarios que controlan la presión arterial son la fuerza del bombeo del corazón (gasto cardíaco) y la resistencia vascular periférica. A su vez, cada uno de ellos depende de diferentes factores como: la contractilidad miocárdica, la frecuencia cardíaca y la volemia para el gasto cardíaco o la vasoconstricción funcional y/o estructural de las arterias de mediano calibre (denominadas de resistencia), que determinan el incremento de las resistencias periféricas. El resultado hemodinámico fundamental derivado de la hipertensión esencial es el aumento persistente de la resistencia vascular, que se puede alcanzar a través de diferentes vías, dando lugar a la vasoconstricción funcional o bien a una hipertrofia de la pared de los vasos sanguíneos (Figura I2) (Kaplan 2003).

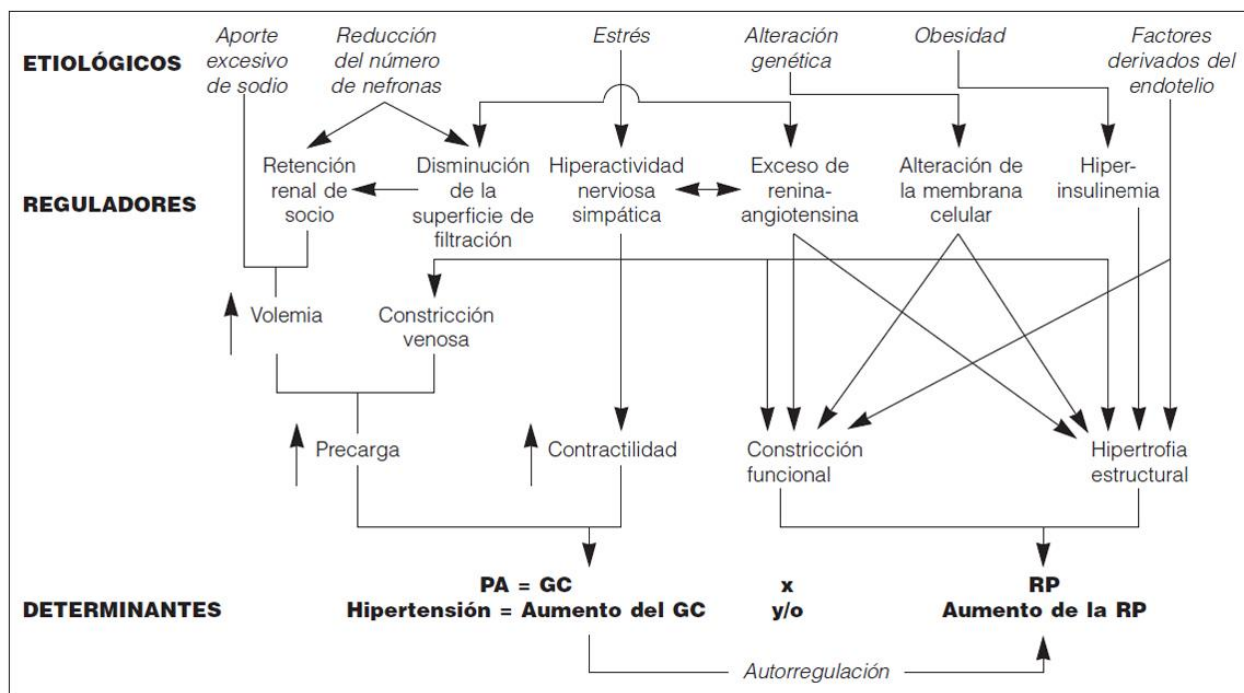


Figura I2. Factores implicados en el control de la presión arterial.

(Adaptado de "Hipertensión Clínica". Norman Kaplan. Cuarta edición en castellano, 2003)

Los cambios en el gasto cardíaco y la resistencia periférica dependen de la interacción de una compleja serie de sistemas reguladores que interactúan entre sí. Por un lado, los sistemas “presores” tienden a elevar la presión arterial (actividad adrenérgica, sistema renina-angiotensina, prostaglandinas, endotelinas), mientras que otros tienden a su disminución (óxido nítrico, bradiquininas, prostaglandinas dilatadoras).

El sistema nervioso simpático es un regulador clave de los cambios en la presión arterial y en la frecuencia cardíaca. Una serie de receptores de presión (barorreceptores), participan en la regulación enviando señales a través de los nervios simpáticos y parasimpáticos, actuando sobre el corazón y el sistema vascular. En la HTA mantenida, estos receptores se reajustan y facilitan la perpetuación de la actividad simpática inapropiadamente elevada (Izzo et al., 1999). De este modo, la mayor liberación de adrenalina y noradrenalina en individuos con HTA esencial da lugar a un aumento en la secreción de renina, provocando el aumento de la reabsorción tubular y disminuyendo la excreción de sodio urinario. Estos cambios dan lugar a una disminución en el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtrado glomerular, favoreciendo la expansión volumétrica (Rumantir et al., 2000; Mancia et al., 2014b).

La activación adrenérgica y mayor síntesis de renina por parte de los riñones da lugar también a la producción de angiotensina y aldosterona. Este sistema hormonal juega un papel primordial en la regulación de la presión arterial y es un mediador clave del daño orgánico en los órganos diana (Hall et al., 1999; Sparks et al., 2014). De este modo, la enzima renina cataliza la conversión del angiotensinógeno en angiotensina-I que, gracias a la acción de la enzima convertidora de angiotensina, da lugar a angiotensina-II. Este potente vasoconstrictor estimula la secreción de vasopresina y aldosterona, provocando la reabsorción de agua y sodio a nivel tubular. Además, angiotensina-II incrementa la respuesta simpática, por lo que se produce una retroalimentación entre el sistema nervioso simpático y el sistema renina-angiotensina-aldosterona que se traduce en la continuación de las resistencias periféricas (Sparks et al., 2014).

El estrés hemodinámico que provoca la HTA puede dar lugar a cambios en la estructura y función del endotelio. Las células endoteliales sufren dos tipos de fuerzas, una llamada “circunferencial” que depende del radio del vaso, grosor y presión sanguínea y una fuerza de “cizalla” o “corte” (*shear stress*), que depende del radio del vaso, viscosidad y velocidad de flujo. En ambos casos, una elevación de la presión sanguínea supone un estrés mecánico que genera cambios en la expresión génica de las células

endoteliales (Topper et al., 1999; Dixit et al., 2005). Esta activación endotelial da lugar a cambios en la síntesis y liberación de numerosos efectores como los vasomoduladores óxido nítrico y endotelina-1, factores de crecimiento, moléculas de adhesión de leucocitos, citoquinas, especies reactivas del oxígeno, etc. (Di Santo et al., 2009; Yang et al., 2010). Estos efectores pueden a su vez provocar cambios estructurales y funcionales como la remodelación vascular, la disfunción endotelial y el incremento de estrés oxidativo, causando una inflamación crónica endotelial que dificulte el manejo y control de la presión arterial (Barbieri et al., 2003; Redon et al., 2003)

Por último, se calcula que alrededor del 60-70% de la HTA esencial puede deberse a factores genéticos, siendo el 30-40% restante debido a influencias ambientales (O'Donnell et al., 1998; Ehret et al., 2013). Además, hábitos de vida sedentarios, como la ingesta elevada de sal y/o alcohol, obesidad y estrés, entre otros, han sido descritos como factores hipertensinogénicos (Gray et al., 2015; Hall et al., 2015).

1.3. Hipertensión arterial, riesgo cardiovascular y renal

La mayoría de los pacientes con HTA presentan otros factores de riesgo cardiovascular y renal adicionales a una elevada presión arterial como son la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico. La presencia de estas enfermedades concomitantes junto con otros factores de riesgo (edad, tabaquismo, dislipemia, historia familiar de enfermedad cardiovascular precoz) y la posible afectación de órganos diana, se han utilizado para estratificar el riesgo a 10 años de padecer un episodio cardiovascular (Mancia et al., 2014a; Martell et al., 2010).

La obesidad está considerada como el principal factor responsable del incremento de la presión arterial. En la cohorte de pacientes *Framingham* se estimó que aumentos de peso del 10% se relacionaban con incrementos de la presión arterial sistólica en 6,5 mm Hg (Ashley y Kannel 1974). La obesidad estaría provocando una elevación de la presión arterial a través del aumento del índice de masa corporal, que se asocia a un incremento del volumen plasmático y del gasto cardíaco (Rocchini et al., 1989; Henry et al., 2012; DeMarco et al., 2014). Por su parte, la asociación de diabetes tipo 2 con la HTA también es muy frecuente, con una prevalencia de esta enfermedad en pacientes hipertensos de alrededor del 70% (Colosia et al., 2013). Además, la presencia de hipertensión y diabetes actúa de forma sinérgica incrementando el riesgo de lesiones renales y en otros órganos diana, aumentando la incidencia de enfermedad coronaria, ictus, enfermedad renal crónica

y mortalidad cardiovascular (Stamler et al., 1993; Mancia et al., 2005; Qiu et al., 2015). Por último, los individuos con síndrome metabólico, que se caracterizan por presentar alteraciones en el metabolismo de glucosa y lípidos así como presión arterial elevada, presentan mayor prevalencia de lesiones en múltiples órganos diana, con aumentos en microalbuminuria, hipertrofia ventricular izquierda y rigidez arterial (Cuspidi et al., 2008).

La HTA puede afectar a diversos órganos como el cerebro, el riñón y el corazón, produciendo un deterioro en su función. Las lesiones subclínicas causadas por la hipertensión en diferentes órganos suponen un estadio intermedio en el *continuum* del daño vascular y actúan como factor de riesgo cardiovascular. Así, la búsqueda de marcadores que permitan evaluar el grado de afectación precoz en órganos diana es fundamental (Figura I3) (Park et al., 2001; Luque et al., 2006; Messerli et al., 2007).

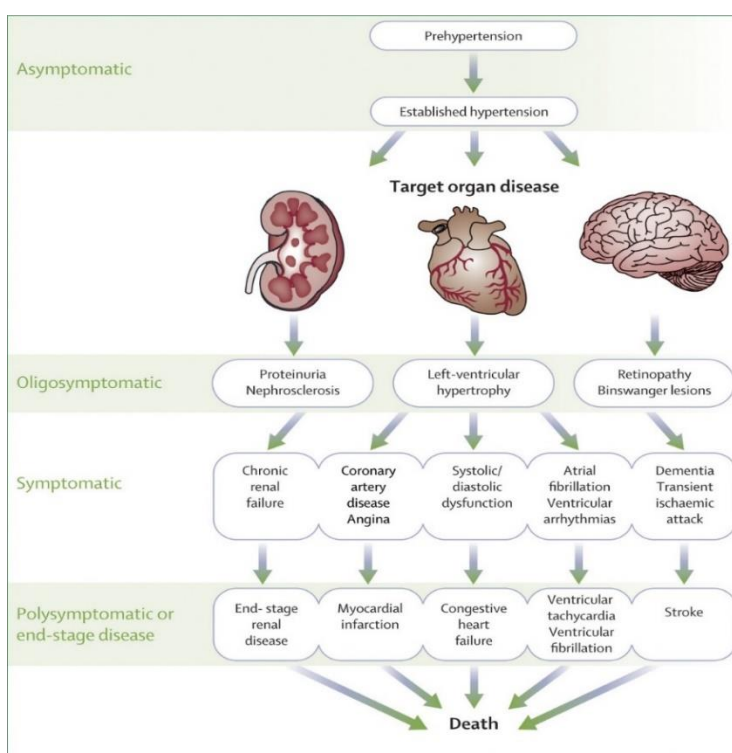


Figura I3. Afectación de órganos diana como consecuencia de la hipertensión. (Adaptado de Messerli et al., 2007)

El daño renal ocurre con frecuencia en la hipertensión, que constituye el segundo factor de riesgo más importante para desarrollar enfermedad renal crónica. Además, la aparición de lesión renal se relaciona con la gravedad de la hipertensión, aumentando el riesgo cardiovascular y utilizándose como predictor de futuros episodios cardiovasculares (Ruilope et al., 2001; de Leuw et al., 2004).

2. DAÑO RENAL EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Estudios poblacionales han demostrado la relación entre la HTA esencial y la aparición y progresión de enfermedad renal crónica en diferentes cohortes (Klag et al., 1996; Tozawa et al., 2013). El aumento de la presión arterial se relaciona con la enfermedad renal a través de dos mecanismos, la transmisión del incremento de la presión arterial a la microvasculatura renal y la aparición de albuminuria/proteinuria debido al deterioro de la barrera de filtración glomerular y su permselectividad (Palmer 2001). Cambios en el tono vascular de la arteriolar aferente glomerular, influidos por el reflejo miogénico y la retroalimentación túbulo-glomerular, protegen al glomérulo de los aumentos de presión sistémica, impidiendo la generación de presión intraglomerular. En el riñón dañado, la disfunción de estos mecanismos permite el aumento de la presión intraglomerular y un estrés hemodinámico en las células que componen el glomérulo (Cerasola et al., 2010).

Actualmente, la evaluación y seguimiento del daño renal en la práctica clínica se basa fundamentalmente en el filtrado glomerular renal y en la excreción urinaria de albúmina (KDIGO *guidelines*, Stevens et al., 2013).

2.1. Marcadores clínicos clásicos: excreción urinaria de albúmina

La albúmina es una proteína soluble, cargada negativamente y muy abundante en el plasma sanguíneo. Se filtra en pequeñas cantidades por el glomérulo y parte es reabsorbida posteriormente por el túbulo renal. En condiciones normales, aparece en la orina a concentraciones inferiores a 20 mg/día y su aumento constituye la primera manifestación clínica de una anómala filtración glomerular. El aumento de la excreción urinaria de albúmina (EUA) por encima de los valores normales se define como “microalbuminuria” y presenta un rango de valores comprendidos entre 30 y 300 mg/día, aunque se suele representar como el cociente EUA (mg) / creatinina (g) (Redon 2006).

El aumento de la EUA se relaciona con la gravedad de la hipertensión y se ha convertido en un marcador pronóstico de riesgo cardiovascular y/o renal utilizado para la estratificación del riesgo en el manejo de la hipertensión (Mancia et al., 2014a). De este modo, aumentos en la EUA han aparecido como predictores de la mortalidad por causas cardiovasculares en la hipertensión (Diercks et al., 2002; Tsioufis et al., 2004). De especial interés resulta el estudio HOPE (*Heart Outcomes Prevention Evaluation study*), en el cuál

se demostró que un mínimo aumento del cociente albúmina/creatinina, incluso dentro de los valores de EUA considerados normales, producía un mayor riesgo de sufrir problemas cardiovasculares (Geirstein et al., 2001). De manera similar, en el estudio LIFE (*Losartan Intervention For Endpoint reduction*) que utilizó pacientes hipertensos con hipertrofia ventricular izquierda, se confirmó que la presencia de microalbuminuria aumentaba la morbimortalidad cardiovascular y se comprobó como los pacientes microalbuminúricos obtenían un mayor beneficio con el tratamiento (Ibsen et al., 2004). También se ha establecido la monitorización de los niveles de EUA como marcador del efecto terapéutico de los tratamientos antihipertensivos, evaluando no sólo el control de la presión arterial, sino una disminución de la progresión de daño renal a estadios más avanzados como macroalbuminuria o proteinuria (Ruggenenti et al., 2001; Pascual et al., 2014).

No obstante, la hiperfiltración de albúmina puede deberse a factores hemodinámicos, como el aumento de la presión intraglomerular, pero también a otros mecanismos como la disfunción endotelial, que pueden activar la liberación de mediadores de estrés oxidativo, factores de crecimiento y provocar inflamación glomerular, dando lugar a proliferación celular, hipertrofia y alteraciones estructurales en la barrera de filtración glomerular (Cooper et al., 2001; Long et al., 2004). Así, aumentos en la EUA se han identificado en numerosas situaciones de riesgo cardiovascular como arteriosclerosis y síndrome metabólico, estado precoz de disfunción endotelial y protrombótico, resistencia a la insulina o incluso en procesos inflamatorios asociados a moléculas de adhesión y proteína C reactiva, así como genéticos, por lo que ha sido propuesto como un marcador integral de enfermedad cardiovascular (Campese et al., 1999; Jager et al., 2002; Stehouwer et al., 2004; González-Maqueda 2007; Martinez et al., 2010; Marrachelli et al., 2014). Por otro lado, los niveles de albúmina en orina están condicionados por procesos que ocurren en dos zonas distintas del riñón, la filtración glomerular y la reabsorción tubular, por lo que un incremento en la EUA puede deberse no sólo a un deterioro de la barrera de filtración glomerular sino a una reducción en la reabsorción a nivel tubular (Scott et al., 2015).

De este modo, la falta de especificidad de este marcador supone una limitación en la evaluación del daño renal asociado a la hipertensión (Comper et al., 2008). Este hecho ha promovido la búsqueda de nuevos biomarcadores que puedan ofrecer información más precisa sobre los cambios fisiopatológicos que se puedan estar produciendo durante el inicio y progresión de la enfermedad renal.

2.2. Nuevos marcadores de lesión glomerular: podocitos y sus componentes

2.2.1. Estructura y función

Los podocitos son células epiteliales diferenciadas que recubren los capilares glomerulares formando así la barrera de filtración glomerular. Presentan una morfología altamente especializada y polarizada, formando prolongaciones llamadas pedicelos o procesos podocitarios, que se entrecruzan dando lugar a interdigitaciones que rodean toda la pared vascular endotelial (Figura I4) (Greka y Mundel 2012a).

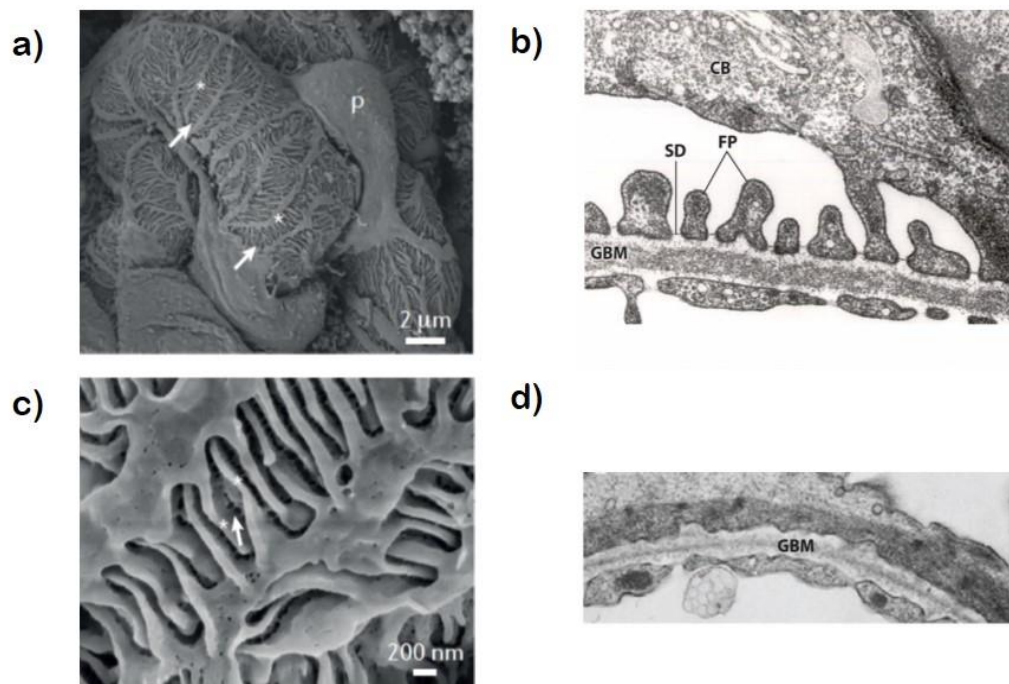


Figura I4. Arquitectura y estructura anatómica de los podocitos y de la barrera de filtración glomerular. a y c) Imágenes de microscopía electrónica de barrido que muestran podocitos recubriendo los capilares y formando pedicelos primarios (a) y secundarios (c). b y d) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión que muestran la membrana basal glomerular (GBM), los pedicelos (FP) formando hendiduras de filtración (SD) y el cuerpo celular (CB). En d) en presencia de proteinuria, se produce el ensanchamiento de pedicelos y se alteran las hendiduras de filtración. (Adaptado de *Perico et al., 2016*)

Su principal función consiste en mantener la permselectividad de la barrera de filtración glomerular, regulando el paso de macromoléculas de la sangre a la orina en base a su tamaño molecular, configuración estructural y carga (Gagliardini et al., 2010). Para ello, entre los pedicelos se desarrollan uniones célula-célula muy particulares, que presentan elementos de uniones estrechas y adherentes y se conocen como hendiduras

de filtración (*slit diaphragm*, en inglés). Estas estructuras forman una barrera física que bloquea el paso de macromoléculas como la albúmina al espacio urinario (Gagliardini et al., 2010). La barrera está compuesta por dos proteínas transmembrana muy similares, nefrina y nephrin, que forman una interacción heteróloga proteína-proteína. (Donoviel et al., 2001). Además, se han identificado otras proteínas clave asociadas a la hendidura de filtración como: podocina (forma microdominios con lípidos para reclutar a nefrina y une la membrana plasmática al citoesqueleto de actina), CD2AP (ancla la hendidura de filtración al citoesqueleto de actina interactuando con nefrina y podocina) o el canal iónico TRPC6 (regula la homeostasis de calcio y participa en la respuesta a estímulos químicos y mecánicos como cambios en la presión intraglomerular) (Figura I5) (Perico et al., 2016).

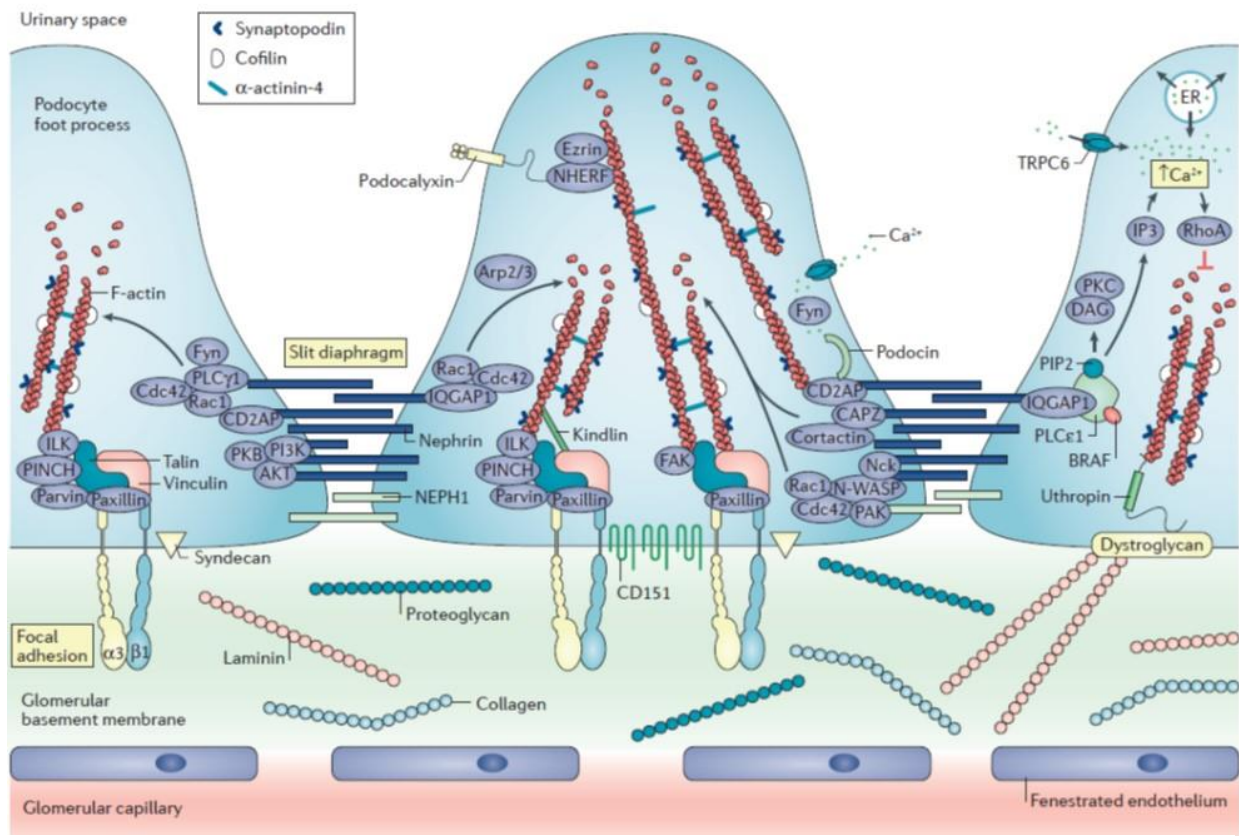


Figura I5. Proteínas que participan en la interacción podocito-podocito formando la hendidura de filtración (*Slit diaphragm*) y el anclaje a la membrana glomerular basal (*Focal adhesion*). En esta vista esquemática se muestran las principales proteínas que forman parte de la hendidura de filtración (nephrin, podocina, CD2AP, TRPC6), complejos de adhesión focal (integrinas, talina, vinculina) y aquellas que participan directamente en la polimerización/despolimerización del citoesqueleto de actina (sinaptopodina, α -actinina, cdc42, Rac1) (Adaptado de *Perico et al., 2016*).

Además de las localizadas en la hendidura de filtración, existen otras proteínas clave en el mantenimiento de la función y arquitectura como *Wilm's Tumor 1* (WT-1). Este factor de transcripción exclusivo de podocitos, controla la expresión de los principales

genes asociados al fenotipo podocitario diferenciado y ha sido utilizado como indicador molecular de la pérdida de podocitos (Guo et al., 2002; Macconi et al., 2005). Por otro lado, proteínas de membrana situadas en la zona apical del podocito como podocalixina, forman complejos con monosacáridos cargados negativamente ayudando a impedir el paso de proteínas al espacio urinario (Kerjaschki et al., 1984). Por su parte, sinaptopodina contribuye al fenotipo contráctil y adaptativo del citoesqueleto de actina que presentan los podocitos y sus pedicelos, actuando sobre diferentes GTPasas que se encargan de reorganizar los filamentos de actina (Figura I5) (Yanagida-Asanuma et al., 2007).

Un aspecto fundamental en la biología del podocito es el anclaje a la membrana glomerular basal en los denominados complejos de adhesión focal. Estos puntos de ensamblaje que conectan el citoesqueleto del podocito a la matriz extracelular, contienen un gran número de proteínas (integrinas, sindecanos, talina, ILK, FAK) que permiten al podocito sentir los estímulos extracelulares, transduciendo la señal y generando cambios internos para adaptar su estructura celular y poder mantener la barrera de filtración glomerular operativa (Figura I5) (Lennon et al., 2014).

2.2.1. Daño podocitario y pérdida de podocitos

La pérdida de podocitos que se produce en el glomérulo durante la progresión de del daño renal crónico se debe fundamentalmente a dos causas: una defectuosa adhesión a la membrana glomerular basal (problemas en la interacción célula y/o pedicelos – matriz extracelular) y un incremento en el estrés mecánico (aumento de la presión intracapilar y excesiva filtración glomerular que daña tanto la hendidura de filtración como la superficie apical) (Topham et al., 1999; Kriz et al., 2014; Kriz y Lemley 2015). El daño podocitario suele comenzar por cambios en su estructura celular, produciendo ensanchamiento y pérdida de pedicelos (*effacement*), alterando la hendidura de filtración y generando un aumento en la EUA (Figura I6) (Mundel et al., 2002). Estas alteraciones pueden examinarse a partir de biopsias renales y estudios histológicos, técnica de referencia para la confirmación diagnóstica de daño glomerular, sin embargo, se trata de un proceso invasivo y con riesgo que no está indicado en pacientes con hipertensión arterial y lesión renal incipiente.

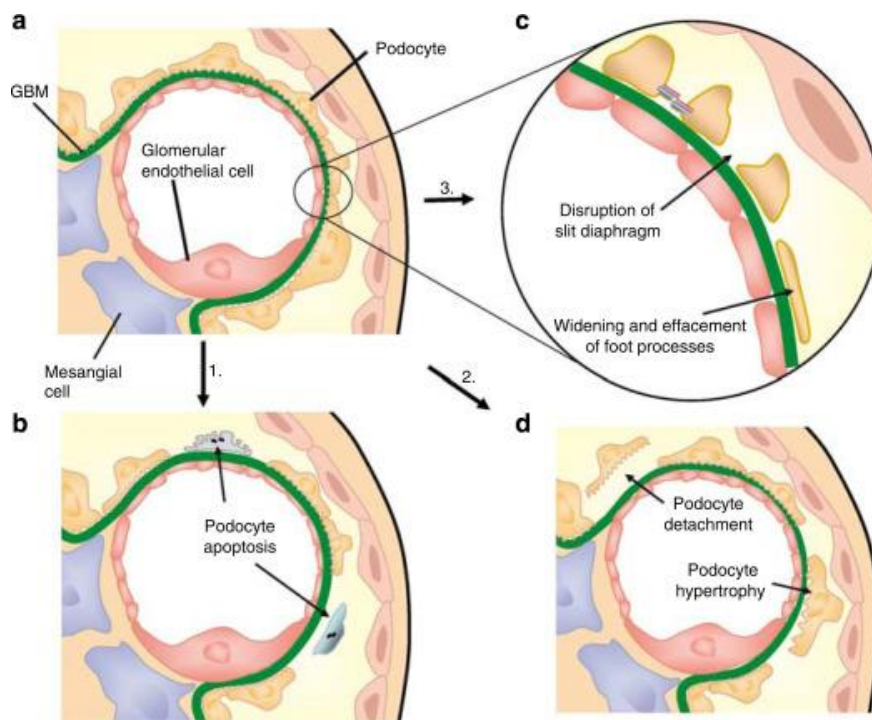


Figura I6. Pérdida de podocitos en el glomérulo.

Diferentes mecanismos de lesión pueden desencadenar cambios en el número de podocitos maduros. Estos cambios pueden producir apoptosis (b), aunque generalmente los podocitos sufren cambios en su tamaño y morfología, tales como un ensanchamiento y pérdida de pedículos (*effacement*) y la alteración de la hendidura de filtración (*slit diaphragm*), soltándose finalmente de la membrana glomerular basal (c y d) (Adaptado de Jefferson et al., 2008)

Por ello, se han desarrollado métodos no invasivos como la monitorización de la liberación de podocitos en orina, podocituria, que no parece ser específica de un mecanismo de lesión particular, sino que más bien refleja el inicio o progresión de daño podocitario y aparece ligada a varias enfermedades glomerulares (Hara et al., 2001; Vogelmann et al., 2003). Aunque la pérdida de podocitos puede ser debida a apoptosis, se ha propuesto que en estadios tempranos de las enfermedades glomerulares el fenómeno predominante consiste en una desdiferenciación o transformación asociada a la enfermedad (Figura I6) (May et al., 2014). Este proceso ha sido relacionado con la transición epitelio-mesenquimal al igual que sufren otras células epiteliales, que en el caso del podocito se produce acoplado a cambios en la síntesis de proteínas clave para la función (nefrina, CD2AP y podocina) y morfología podocitaria (sinaptopodina, α -actinina). De este modo, los podocitos se desdiferencian y desenganchan de la membrana glomerular basal, dando lugar a un aumento de estas células en la orina, hecho que ha sido relacionado con la afectación renal en varias nefropatías y propuesto como marcador precoz de daño glomerular (Mueller-Deile et al., 2012; Vogelmann et al., 2003). Estudios previos en nuestro grupo con pacientes de nefropatía lúpica activa, han demostrado que aumenta tanto el número total como la proporción de podocitos desdiferenciados pero viables a medida que aumenta la proteinuria (Perez-Hernandez et al., 2016). La influencia de la hipertensión en la pérdida de podocitos no ha sido investigada en profundidad, aunque estudios *in vivo* también han sugerido que los podocitos se desenganchan de la

membrana basal y que este proceso se agrava en zonas de la nefrona donde aumenta la presión intraglomerular como los glomérulos yuxtamedulares (Sofue et al., 2012; Kriz y Lemley 2015; Puelles et al., 2016; Seccia et al., 2017).

Otra variante del uso de podocitos en orina como técnica no invasiva ha consistido en cuantificar el ARNm y proteínas de genes asociados a podocitos en el sedimento urinario. El estudio de los cambios en estos niveles se ha mostrado como una herramienta eficaz para monitorizar enfermedades glomerulares y conocer el estado de la función podocitaria (Muller-Deile y Schiffer 2017). Por lo que respecta a las proteínas, la detección se ha llevado a cabo mediante citometría de flujo, ELISA o *western blot* para la detección de componentes de la hendidura de filtración como nefrina (Nakatsue et al., 2005; Kandasamy et al., 2014; Perez-Hernandez et al., 2016). En un estudio previo, el aumento de nefrina apareció asociado a albuminuria en pacientes de diabetes tipo 2 (Ng et al., 2011). Esta proteína también se detectó en otra cohorte de pacientes diabéticos tipo 1, sugiriéndose su papel como biomarcador de complicaciones en el riñón (Patari et al., 2003). Recientemente nuestro grupo demostró que niveles proteicos de nefrina, podocina, WT-1 y sinaptopodina aumentaban en el sedimento urinario de pacientes con nefropatía lúpica a medida que lo hacía la proteinuria, sugiriendo un papel discriminativo de estos niveles entre grupos de enfermedad (Perez-Hernandez et al., 2016). En el caso de la cuantificación de los niveles de ARNm, Sato y colaboradores demostraron que los podocitos que se desenganchan de la membrana glomerular pierden la expresión de nefrina durante la progresión de la glomeruloesclerosis (Sato et al., 2009). En los últimos años, varios estudios desarrollados en nefropatía diabética han descrito cambios en los niveles de expresión de otros genes como podocalixina, podocina, sinaptopodina, WT-1, CD2AP y los han relacionado con marcadores clínicos como EUA, proteinuria o filtrado glomerular renal y la progresión de la enfermedad renal (Wang et al., 2007, 2008 y 2010).

2.3. Comunicación intercelular en el glomérulo renal: *Integrative Glomerular Barrier Complex*

El glomérulo renal maduro está compuesto además de por podocitos, por células endoteliales glomerulares (CEg) y células mesangiales, elementos clave en el mantenimiento de la barrera de filtración glomerular.

Las CEg conforman el endotelio vascular en el glomérulo y su característica principal es que contienen numerosos poros transcelulares (*fenestrae*) de 60–80 nm de

diámetro que ocupan hasta un 40% de su superficie celular, aumentando la permeabilidad al agua del endotelio glomerular (Deen et al., 2001; Satchell y Braet 2009). Los poros aparecen densamente recubiertos por glicosaminoglicanos como ácido hialurónico y condroitin sulfato, que actúan anclando el glicocálix endotelial a la membrana glomerular basal y constituyendo una primera barrera contra el filtrado de macromoléculas como la albúmina (Jeansson y Haraldsson 2006; Dane et al., 2013). Por su parte, las células mesangiales realizan una importante función estructural en el glomérulo, pero además interactúan con podocitos y endotelio, secretando factores de crecimiento y promoviendo diversas vías de señalización (Schlöndorff y Banas 2009).

Varios estudios llevados a cabo *in vitro* y con modelos animales han demostrado que existe comunicación intercelular en el glomérulo renal que incluye numerosos mediadores como factores de crecimiento, óxido nítrico, citoquinas. De este modo, alteraciones en los niveles de estos mediadores afectan a la homeostasis intraglomerular, impidiendo un correcto funcionamiento de la barrera de filtración (Figura I7) (Haraldsson 2014; Barlett et al., 2016).

Un factor de crecimiento clave en la nefrogénesis es PDGF β (del inglés, *platelet-derived growth factor- β*). Esta molécula es producida por las CEG adyacentes durante la maduración del glomérulo y es indispensable para la migración y proliferación de las células mesangiales (Lindahl et al., 1998; Bjarnegard et al., 2004). Un aumento en la proliferación de estas células aparece como elemento desencadenante de algunas glomerulonefritis como la Nefropatía IgA y también ha sido descrito en la iniciación y progresión de la nefropatía diabética (Schlöndorff y Banas 2009; Liu et al., 2012).

En otros casos, la concentración intraglomerular de moléculas como TGF- β provoca cambios en la comunicación paracrina entre podocitos y CEG. Daehn y colaboradores demostraron como una activación selectiva del receptor de TGF- β en podocitos daba lugar a un aumento en la secreción de Endotelina-1, cambio que afectaba a las CEG vecinas provocando una reducción en la actividad enzimática óxido nítrico sintasa, produciendo estrés oxidativo y disfunción endotelial. Este proceso desencadenaba a su vez la liberación de otros factores al medio por parte de las CEG y apoptosis en podocitos (Daehn et al., 2014). De manera similar, otros trabajos han descrito como una deficiencia en la producción de óxido nítrico por parte de las CEG predispone al daño podocitario en condiciones hiperglicémicas (Yuen et al., 2012) y como, por el

contrario, una sobreexpresión de la enzima óxido nítrico sintasa en CEG protege a los podocitos del daño causado por $\text{TNF-}\alpha$ *in vitro* (Sun et al., 2013).

También se ha demostrado la existencia de micro ARNs que pueden ser liberados en respuesta a cambios de citoquinas o factores de crecimiento, actuando como mediadores en la comunicación paracrina intraglomerular. Un estudio muy interesante del grupo del Dr. Schiffer, ha demostrado recientemente como la estimulación de células glomerulares humanas con $\text{TGF-}\beta$ aumenta la expresión de miR-143-3p sólo en podocitos, sin embargo, la regulación génica afecta también a las CEG vecinas. Utilizando el modelo pez cebra, detectaron como miR-143-3p disminuía la expresión de diferentes proteoglicanos (sindecanos y versicanos) que forman parte del glicocáliz de CEG y podocitos, provocando ensanchamiento de pedicelos, inflamación del endotelio glomerular y proteinuria (Müller-Deile et al., 2016).

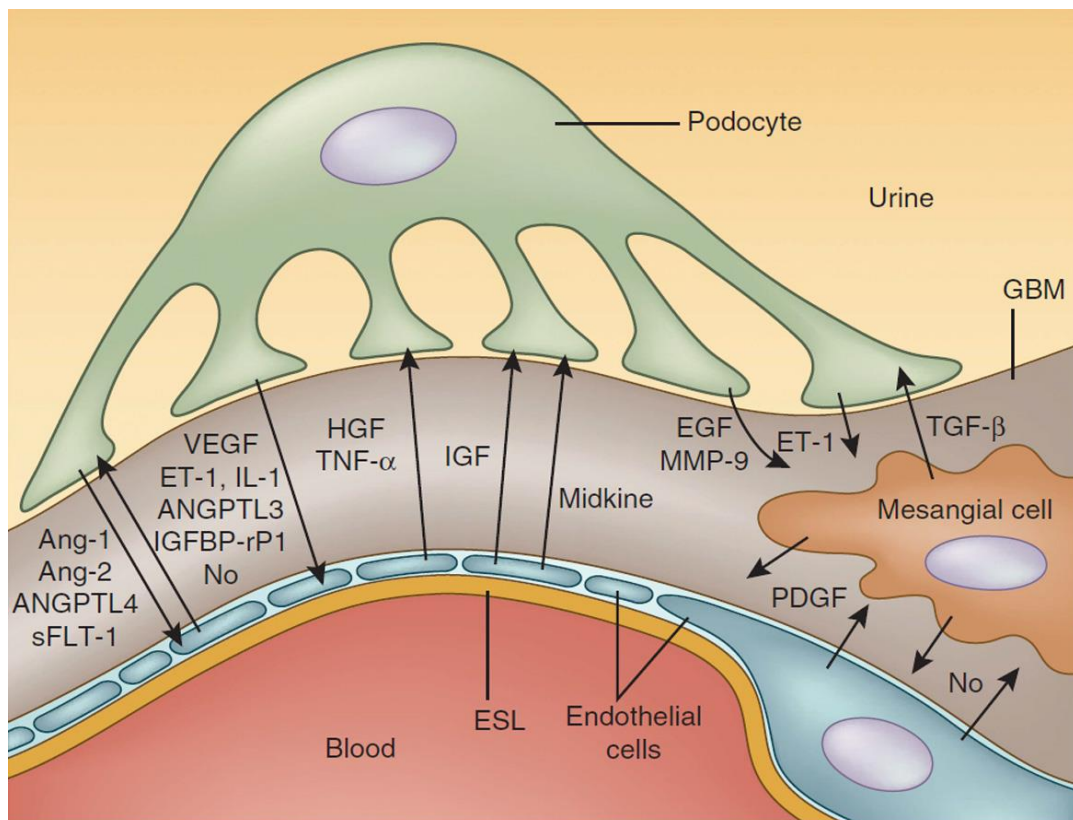


Figura I7. Modelo *integrative glomerular barrier complex*. Este modelo integrativo está compuesto por células endoteliales glomerulares y su glicocáliz (ESL), la membrana glomerular basal (GBM) formada por la matriz extracelular de podocitos y células endoteliales, podocitos con sus pedicelos y células mesangiales. El medio intersticial que rodea a las células y la membrana glomerular basal conforman el microambiente glomerular, donde se encuentran diversos tipos de mediadores (factores de crecimiento, citoquinas y otros factores no conocidos) secretados por las células que lo conforman y que actúan de forma paracrina. De este modo, los tres tipos celulares interactúan entre sí mediante una compleja y equilibrada red de señales moleculares para mantener la homeostasis. (Adaptado de *Haraldsson et al., 2014*)

En vista de estos estudios, algunos autores han apuntado recientemente la idea de un modelo “integrativo” para hablar de la barrera de filtración glomerular (*Integrative Glomerular Barrier Complex*). Esta propuesta cambia la típica aproximación de “célula o componente más importante” del sistema por una visión más “holística”, en el que sus componentes (CEg, células mesangiales y podocitos) interactúan intercambiando diversos tipos de moléculas, manteniendo de esta forma la integridad de la función glomerular (Figura I7) (Haraldsson 2014).

3. MICRO ARNs

3.1. Definición

Los micro ARNs (miARNs) son moléculas cortas de ARN (20-22 nucleótidos) que no codifican para proteínas, pero regulan la expresión génica de numerosos genes interaccionando con la región 3'-UTR (no traducida) del ARNm diana, impidiendo la síntesis de proteínas (Bartel 2009). Son moléculas muy conservadas evolutivamente que están presentes en plantas, virus y animales inferiores, así como en todos los tipos celulares (Ambros 2004). Se han descrito más de 2500 miARNs diferentes en humanos, aunque trabajos recientes apuntan a la existencia de varios miles más (Griffiths-Jones et al., 2008; Backes et al, 2016a).

3.2. Biogénesis y regulación epigenética

Los miARNs maduros se generan tras un proceso de varios pasos que incluye su transcripción y maduración en el núcleo, la exportación al citoplasma y el procesado final junto con la unión de diversas proteínas para formar el complejo de silenciamiento (Figura X). Inicialmente, se generan transcritos primarios de miARN conocidos como “pri-miARNs” que contienen varios miles de pares de bases de longitud. A partir de ahí, se produce una primera maduración nuclear llevada a cabo por la RNasa III “Drosha”, que genera una secuencia de 70-100 nt formando una horquilla en la zona central de la secuencia. Esta molécula constituye el precursor de miARN (pre-miARN) y se transporta al citoplasma mediante exportinas para su maduración final. Una vez en el citoplasma, los pre-miARNs son cortados por segunda vez por otra RNasa III, “Dicer”, dando lugar a dos hebras que forman un dúplex de 20-22 nt. Posteriormente, sólo una de las dos hebras o brazos es seleccionada (5p o 3p) y con la ayuda de una serie de proteínas da lugar al complejo ribonucleoproteico RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Figura I8) (Ambros 2004).

Generalmente, la regulación postranscripcional tiene lugar en el citoplasma de la célula, y sólo existe complementariedad parcial entre la zona 5' del miARN conocida como *seed* (2º-7º nucleótido) que reconoce e hibrida con la secuencia diana del ARNm, situada normalmente en la zona 3'-UTR. De este modo, los miARN maduros actúan como guía para el ribocomplejo RISC que puede catalizar la degradación directa del ARNm o, como ocurre de manera más extendida en mamíferos y otros organismos superiores, bloqueando la traducción y síntesis proteica al no permitir la unión o elongación del

ribosoma y desestabilizando a la molécula de ARNm (Lim et al., 2005). En este segundo mecanismo parece que las proteínas de la familia argonauta jugarían un papel fundamental dentro del complejo RISC (Schwarz et al., 2003).

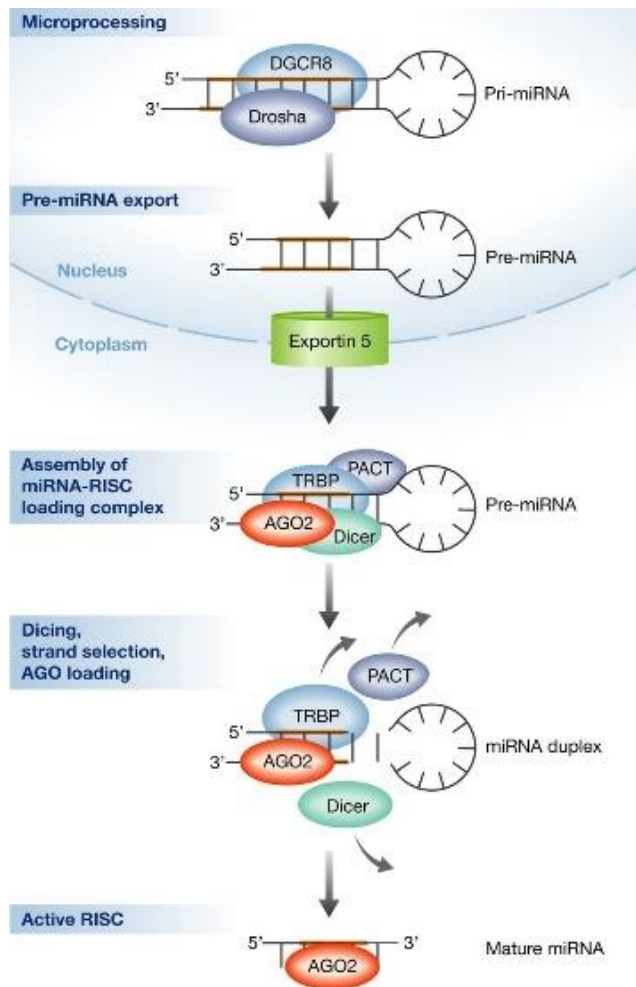


Figura I8. Formación y maduración de los miARN.

Los miARNs sufren un proceso de maduración dentro del núcleo donde pasan de pri-miARN a pre-miARN. Seguidamente, son exportados al citoplasma donde son procesados por Dicer y otras proteínas para formar el complejo RISC maduro. (Adaptado de Emde y Hornstein 2014)

Los miARNs maduros se pueden generar a partir de transcritos codificados por diferentes posiciones del genoma (*loci*) y muchos de ellos lo hacen agrupados en *clusters*, formando parte de una misma familia. Además, debido a que la hibridación con los ARNm es parcial y de tan sólo unos pocos nucleótidos, su acción es pleiotrópica y un solo miARN puede estar actuando sobre una gran cantidad de ARNm diana y, por tanto, regular la expresión génica de muchos genes a la vez. Del mismo modo, un mismo ARNm puede contener numerosos sitios de unión para muchos miARNs diferentes, generando una compleja red de interacciones miARN-ARNm con acciones combinadas sinérgicas o antagónicas (Lim et al., 2005; Bartel 2009). Se estima que la regulación epigenética por miARNs afecta a la expresión de alrededor del 60% de los genes humanos codificantes para proteínas (Ambros 2004).

3.3. micro ARNs circulantes como biomarcadores

Los miARNs que se liberan al medio extracelular presentan una serie de características que los han convertido en candidatos ideales para ser utilizados como biomarcadores en la práctica clínica: a) se pueden obtener de manera no invasiva, b) son altamente estables en circulación, c) presentan alta especificidad en función del tejido y del estado fisiopatológico del individuo, d) cambian su perfil durante la progresión de la enfermedad y, e) se pueden cuantificar de manera rápida y fiable en los laboratorios (Lorenzen et al., 2011; Witwer 2015).

Estas pequeñas moléculas de ARN han demostrado ser estables en la circulación, pudiendo ser detectados y cuantificados en numerosos fluidos biológicos tales como suero, plasma, saliva y orina, donde existe una alta presencia de ribonucleasas que degradan ARN (Mitchell et al., 2008; Simpson et al., 2016; Blondal et al., 2017). Esto se debe principalmente a la protección que le otorga su asociación formando complejos ribonucleoproteicos con proteínas de la familia argonauta (Ago2), formando parte de lipoproteínas (HDL y LDL) y transportados en el interior de las vesículas extracelulares (exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos) (Figura I9) (Chen et al., 2012).

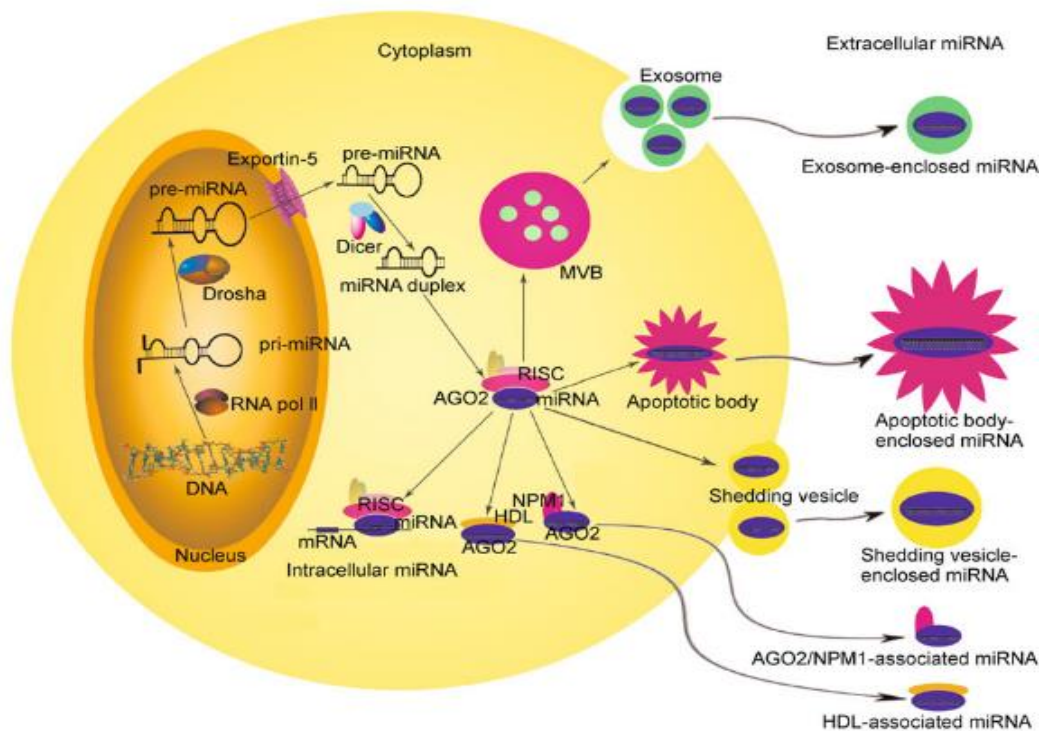


Figura I9. Liberación de miARNs al medio extracelular. Los miARNs maduros son liberados al medio extracelular formando complejos ribonucleoproteicos con Ago2 y otras proteínas, asociados a lipoproteínas como HDL o empaquetados y transportados dentro de las vesículas extracelulares. (Adaptado de *Chen et al., 2012*)

La participación de los miARNs en el control de la expresión génica de numerosos procesos fisiológicos ha sido bien documentada desde su aparición. Procesos clave como el ciclo y diferenciación celular, la respuesta inmune o la apoptosis aparecen regulados por múltiples miARNs (Alvarez-Garcia y Miska 2005; Bartel 2009; Lee et al., 2014). A su vez, alteraciones en los niveles de miARNs circulantes han sido asociadas con el inicio y la evolución de numerosos procesos patológicos tales como cáncer, enfermedades autoinmunes, metabólicas y neurológicas, pudiendo ofrecer información sobre el estado patofisiológico del individuo (Calin y Croce 2006; Alevizos y Illei 2010; Esteller 2011). En las enfermedades cardiovasculares, varios trabajos han evaluado la capacidad predictiva de los miARNs circulantes. Por ejemplo, se ha sugerido el potencial pronóstico de miR-197 y miR-223 como predictores de morbilidad asociados a un aumento en el riesgo de infarto de miocardio (Zampetaki et al., 2012; Schulte et al., 2013). De manera similar, también se ha propuesto un panel de 5 miARNs que presenta mejoras en la predicción de riesgo de infarto en individuos sanos (Bye et al., 2016). Por lo que respecta a las enfermedades renales, cambios en los niveles de miARNs circulantes han sido descritos en biofluidos como orina, suero y plasma (Nassirpour et al, 2014; Lv et al., 2015; Al-Kafaji et al., 2016), y han sido propuestos como marcadores tempranos y de progresión de daño renal en enfermedades como diabetes (Argyropoulos et al., 2015), síndrome nefrótico (Luo et al., 2013) e insuficiencia renal crónica (Neal et al., 2011).

A pesar del gran potencial que presentan los miARNs para convertirse en biomarcadores de uso corriente en la práctica clínica, existen dificultades relativas a su especificidad en el diagnóstico y biofluido que han dado lugar a resultados equívocos y poco comparables entre sí (Witwer 2015; Navickas et al., 2016). Una posible causa es que todavía existen dudas sobre si los miARNs que están formando parte de complejos proteicos o lipoproteínas son liberados de forma específica y selectiva (Wagner et al., 2013). Para mejorar la probabilidad de encontrar miARNs más específicos y sensibles se ha propuesto el fraccionamiento de biofluidos, aislando y separando las vesículas extracelulares (VE) del resto de estructuras que transportan miARNs. Estudios previos llevados a cabo por otros autores y nuestro grupo han demostrado que una gran parte del *pool* de miARNs circulantes en biofluidos se encuentran dentro de las VE, y cómo el estado patofisiológico del individuo y la progresión de la enfermedad renal puede aumentar el transporte selectivo de miARNs vía VE (Gallo et al., 2012; Lv et al., 2013; Perez-Hernandez et al., 2015).

3.4. Papel de los micro ARNs en la hipertensión y microalbuminuria

En el desarrollo de la hipertensión, diversos estudios han puesto de manifiesto la implicación de los miARNs en el control de la presión arterial, normalmente asociados a la regulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona. El equipo de Marques y colaboradores llevaron a cabo un screening de 850 miARNs en el riñón de pacientes hipertensos y sanos, en el cuál identificaron a miR-181a y miR-663 regulando el silenciamiento génico de renina (Marques et al., 2011). También se ha observado que la expresión de miR-145 está aumentada en las placas de ateroma de pacientes con presión sistólica elevada, provocando mayor daño vascular en estos pacientes (Santovito et al., 2013). De manera similar, otro experimento ha demostrado que ratones *knockout* para el *cluster* miR-143/145 mostraban un descenso en la presión arterial frente a los *wt*, identificando al gen de la enzima convertidora de angiotensina como diana de miR-145 (Boettger et al., 2009). En la misma línea, el grupo de Eskildsen han cuantificado un aumento en los niveles de miR-132 y miR-212 en corazón, aortas y riñón de ratas tratadas con angiotensina-II, sugiriendo la participación de estos miARNs en la aparición y mantenimiento de la hipertensión arterial (Eskildsen et al., 2013).

Otros trabajos han relacionado la predisposición a hipertensión arterial esencial debido a la presencia de SNPs en zonas 3'-UTR de los ARNm diana, los cuáles estarían alterando los sitios de unión de los miARNs, modificando su capacidad de regular la expresión génica. De este modo, se han encontrado SNPs en el gen del receptor de angiotensina-II y acetilcolinesterasa que alteran la regulación ejercida por miR-155 y miR-608, respectivamente, produciendo un aumento en la presión arterial (Sethupathy et al., 2007; Hanin et al., 2014).

En los últimos años, varios estudios han comparado el perfil de miARNs circulantes de pacientes hipertensos frente a normotensos. Esta aproximación ha permitido identificar nuevos miARNs que puedan estar jugando un papel importante en el desarrollo de la hipertensión (Figura I10) (Romaine et al., 2016). Por ejemplo, Yang y colaboradores han llevado a cabo trabajos con *microarrays* y han encontrado varios miARNs alterados en el plasma de pacientes hipertensos, validando y proponiendo miR-505 como biomarcador de prehipertensión (Yang et al., 2014). De forma similar, Karolina y colaboradores han descrito cambios de varios miARNs en pacientes hipertensos con síndrome metabólico (miR-130a, miR-195 y miR-92a) en sangre. Los resultados también mostraron que solamente miR-92a, que actúa sobre el receptor de angiotensina-II, se encontraba

diferencialmente expresado en exosomas de suero (Karolina et al., 2012). Por último, en exosomas de orina también se ha descrito un perfil de miARNs único asociado a los cambios en la presión arterial, como respuesta a la ingesta de sal en la dieta. Este hecho demostraría como existen cambios en el transporte de miARNs vía exosomas asociados a la presión arterial del individuo y su respuesta al sodio (Gildea et al., 2013).

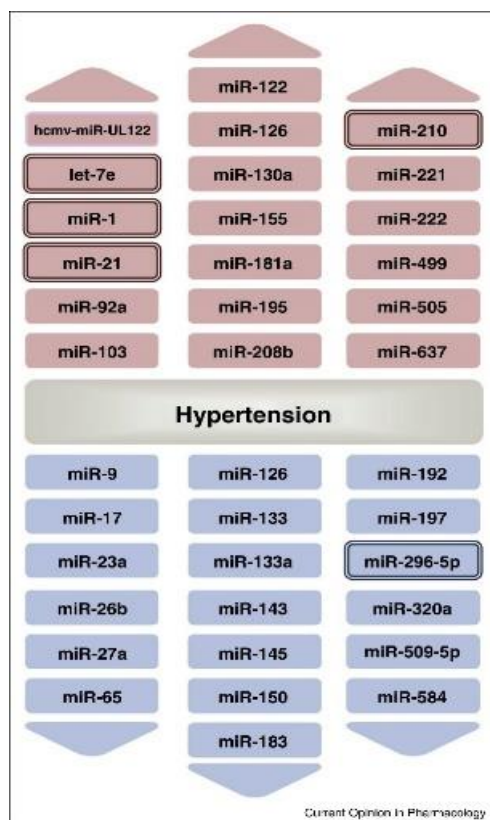


Figura 110. Micro ARNs circulantes que aparecen en estudios asociados a la hipertensión en humanos.

En rojo aparecen los que aumentan en presencia de hipertensión y en azul los que disminuyen. Los que presentan doble recuadro indican aquellos miARN que aparecen relacionados con la enfermedad en más de un estudio. (Adaptado de Romaine et al., 2016)

La hipertensión arterial contribuye a la aparición de enfermedad renal al aumentar la presión intraglomerular, provocando también disfunción endotelial, esclerosis y daños sobre la nefrona (Sowers et al., 2001). En el riñón, los miARNs son indispensables para el desarrollo renal, así como para mantener la homeostasis de la barrera de filtración glomerular, destacando su papel como mediadores en la aparición y progresión de enfermedad renal, regulando complejas redes de interacción génica (Lorenzen et al., 2011; Chandrasekaran et al., 2012).

Por lo que respecta al desarrollo de microalbuminuria, la mayoría de estudios que se han llevado a cabo han utilizado modelos animales o pacientes de nefropatía diabética (Simpson et al., 2016). Debido a la fisiopatología de esta enfermedad, la mayor parte de miARNs encontrados han sido relacionados con la aparición de fibrosis en diferentes

zonas de la nefrona. Por ejemplo, MiR-429, miR-141 y la familia miR-200 han sido relacionados con el mantenimiento del fenotipo epitelial, viéndose suprimida su expresión al aumentar TGF- β (Simpson et al., 2016). Otro miARN que estaría condicionado por la presencia de TGF- β es miR-21, regulando la proliferación de células renales tubulares en rata (Lin et al., 2014). Por su parte, se han cuantificado valores aumentados o disminuidos de miR-192, dependiendo del tipo celular y estadio de la nefropatía diabética, controlando la expresión de E-cadherina y colágeno (Wang et al., 2010; Jenkins et al., 2012). En la misma línea, efectos antifibróticos y protectivos para los podocitos han sido asociados a la familia miR-29 en condiciones diabéticas (Lin et al., 2014).

Como ha ocurrido en la hipertensión, recientemente muchos estudios para identificar nuevos miARNs involucrados en la aparición de lesión renal se han centrado en el análisis de los miARNs circulantes en distintos biofluidos. En esta línea, los trabajos de Argyropoulos han demostrado como los niveles de miARNs cambian a lo largo de la nefropatía diabética y han propuesto un perfil de miARNs urinarios como predictores de microalbuminuria en pacientes con diabetes tipo 1 (Argyropoulos et al., 2013 y 2015). De manera similar, otros autores han descrito cambios puntuales en los niveles de miR-130b y miR-192 en suero y miR-126 en plasma, correlacionando los cambios en los niveles de miARNs con variables clínicas de función renal como FGR o la excreción urinaria de albúmina (Lv et al., 2015; Al-Kafaji et al., 2016; Ma et al., 2016).

4. VESÍCULAS EXTRACELULARES

4.1. Origen, características biológicas y tipos de vesículas extracelulares

El término general “vesículas extracelulares” (VE) incluye a diversos tipos de pequeñas estructuras membranosas esféricas no homogéneas, rodeadas por una bicapa lipídica y liberadas activamente al medio extracelular por numerosos tipos celulares. Las VE presentan solapamiento de tamaños y se clasifican según diferentes parámetros como su biogénesis, composición bioquímica y morfología (Tabla I2) (Cocucci et al., 2009; Mathivanan et al., 2010).

Tabla X. Principales características de las vesículas extracelulares.

Tipo de VE	Tamaño	Biogénesis	Marcadores	Contenidos
EXOSOMAS	40-130 nm	Vía endolisosomal. Liberación por exocitosis a partir de la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática	Tetraspaninas (CD63, CD9, CD81), Alix, TSG101, Hsp60, Hsp70, Hsp90	ARNm, miARN, lípidos (colesterol, ceramida, esfingomielina), receptores de membrana, moléculas MHC
MICROVESÍCULAS	100-1000 nm	Evaginación de la membrana plasmática	Integrinas, selectinas, metaloproteasa, fosfatidil-serina	ARNm, ARNp, receptores de membrana, proteínas citoplásmicas
CUERPOS APOPTÓTICOS	50-5000 nm	A partir de protusiones de la membrana plasmática durante la apoptosis	Fosfatidil-serina, histonas	Fracciones nucleares, orgánulos, ADN, ARNr, ARNm

Abreviaturas: VE: vesículas extracelulares; Hsp: *heat shock proteins*; MHC: *major histocompatibility complex*; ARNm: ARN mensajero; miARN: micro ARN; ARNr: ARN ribosómico; TSG101: *tumour susceptibility gene 101*.

Los exosomas son las VE más pequeñas (40-130 nm) y se forman a partir de invaginaciones internas de los compartimentos endosomales, acumulándose en vesículas intraluminales conocidas como “cuerpos multivesiculares”. Los exosomas son liberados al medio extracelular mediante la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática (Kowal et al., 2014). Debido a su biogénesis, este tipo de VE presenta un

enriquecimiento en tetraspaninas y otros marcadores implicados en el tráfico intravesicular y transducción de señal (TSG 101, proteínas de la familia Rab) (Yáñez-Mó et al., 2015) (Tabla I2) (Figura I11). Las microvesículas (MV), también conocidas como micropartículas, son generalmente más grandes que los exosomas y presentan mayor variabilidad en cuanto al rango de tamaños encontrados (100-1000 nm). Se generan directamente a partir de evaginaciones de la membrana plasmática, y por este motivo contienen receptores celulares, integrinas y fosfolípidos como fosfatidil-serina en su membrana (Figura I11)(Akers et al., 2013). Por último, también se incluyen los cuerpos apoptóticos dentro de las VE, siendo estos más diversos en cuanto a su tamaño (hasta 5 μm), morfología y composición. Se generan a partir de células apoptóticas y también contienen fosfatidil-serina en la membrana externa y marcadores apoptóticos en su interior debido a su origen (histonas, DNA fragmentado) (Tabla I2).

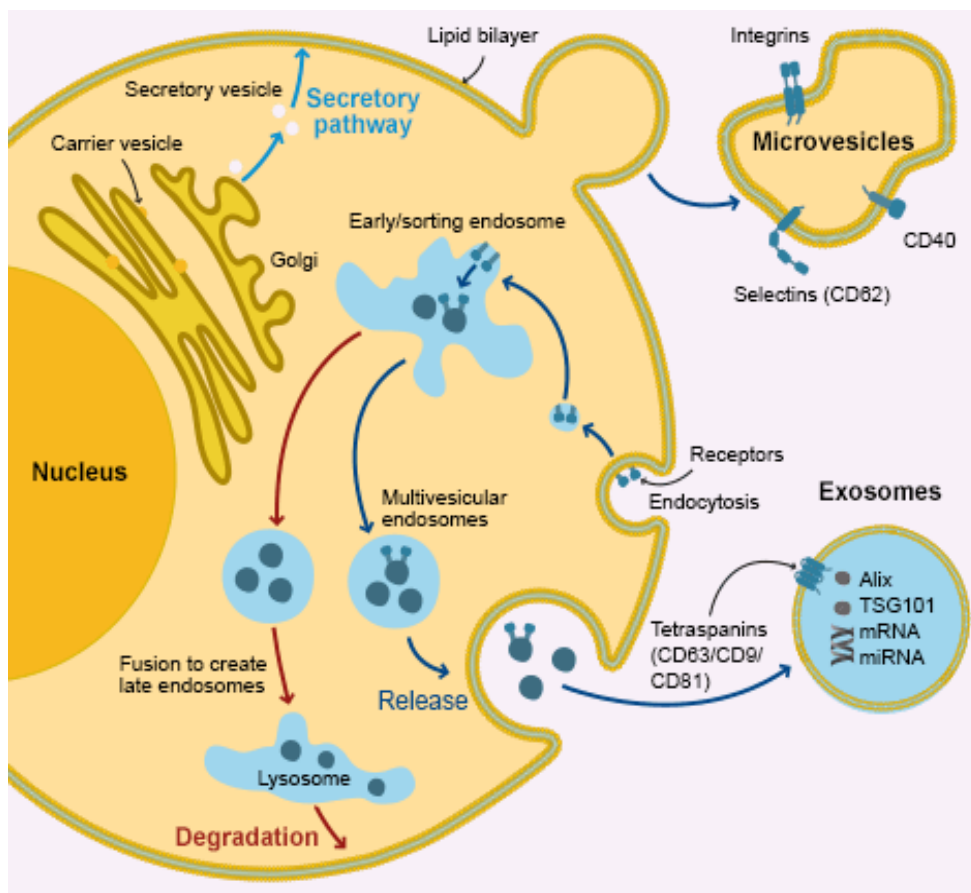


Figura I11. Biogénesis de microvesículas y exosomas.

Las microvesículas se generan directamente a partir de evaginaciones de la membrana plasmática mientras que los exosomas son liberados a partir de compartimentos endosomales conocidos como cuerpos multivesiculares. (Adaptado de Raposo et al., 2013)

4.2. Comunicación intercelular mediada por vesículas extracelulares

La comunicación intercelular mediante la liberación de VE es un mecanismo conservado en la evolución, siendo descrita su secreción al medio extracelular por numerosos tipos celulares y formando parte de biofluidos como orina, plasma, líquido cerebroespinal, saliva o leche materna (Yáñez-Mó et al., 2015; Lässer et al., 2011). Las VE tienen la capacidad de transportar información biológica desde la célula parental o de origen a la célula receptora o diana, transfiriendo en su interior ácidos nucleicos (ARN de diversos tipos, ADN nuclear y mitocondrial), proteínas y lípidos (Lässer et al., 2011; Lázaro-Ibáñez et al., 2014).

El proceso de captación de VE por las células receptoras está facilitado por moléculas presentes en la superficie de la membrana vesicular, permitiendo así su identificación e interacción. En este aspecto, las VE pueden interactuar con la célula diana de varias formas: a) activando vías de señalización en la célula diana por la interacción con moléculas de adhesión celular y receptores específicos sin fusionarse con la membrana; b) mediante la fusión directa de ambas membranas y la transferencia horizontal de información genética (ARNm, miARN, ADN), proteínas y moléculas de señalización; c) iniciando la endocitosis mediada por receptor por parte de la célula diana y el procesado por la vía endolisosomal (Figura I12) (Clayton et al., 2004; Fevrier et al., 2004; Mittelbrunn et al., 2011).

Las VE participan en el mantenimiento de numerosos procesos fisiológicos como la presentación de antígenos en el sistema inmune, reparación de tejidos, mantenimiento de la pluripotencia en células madre o interacción huésped-parásito (Ratajczak et al., 2006; Mittelbrunn et al., 2011, Gatti et al., 2011; Montaner et al., 2014). Dado su importante papel en la regulación de funciones biológicas tan diversas, se ha descrito su participación en el origen y progresión de una amplia variedad de procesos fisiopatológicos. Así, se ha descrito el papel de las VE en la progresión tumoral y en la formación del nicho pre-metastático, promoviendo la angiogénesis y degradando la matriz extracelular (Paggetti et al., 2015; Peinado et al., 2012). Además, la actuación de las VE como efectores paracrinós también se ha estudiado en la arterioesclerosis y otras enfermedades cardiovasculares (Fleury et al., 2014; Kapustin et al., 2015).

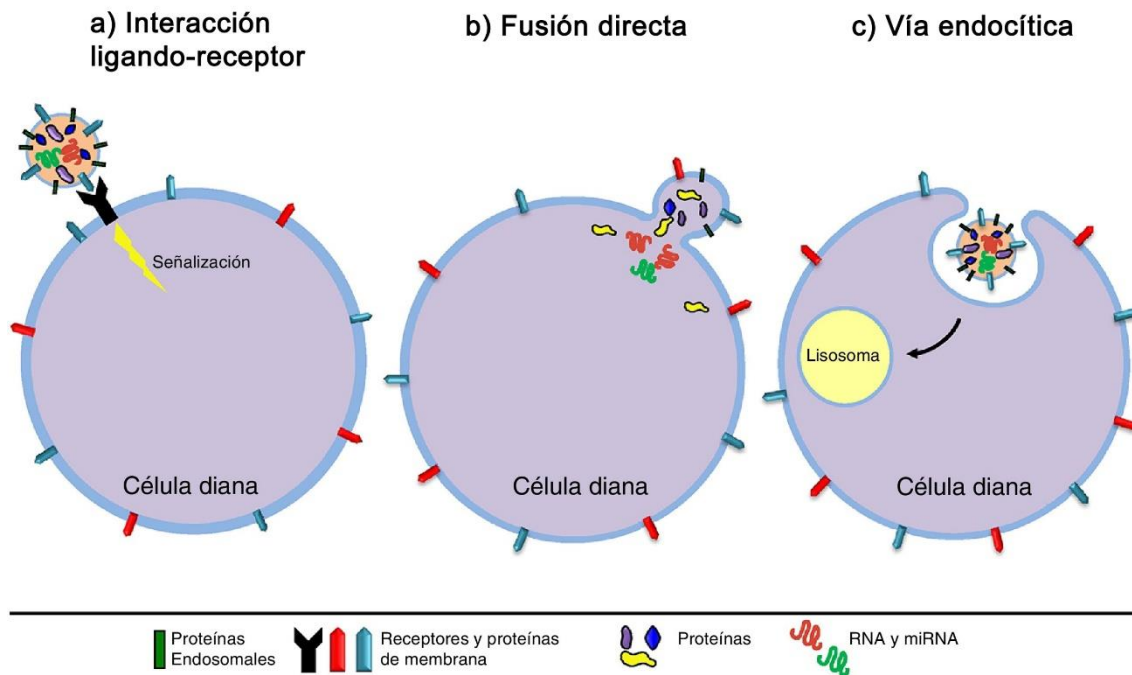


Figura I12. Mecanismos de interacción de las VE con las células receptoras. Las VE interactúan de diferentes maneras con las células diana. a) Mediante la interacción ligando – receptor, provocando cambios en la señalización intercelular; b) Siendo internalizadas mediante fusión directa de las membranas; c) Siendo internalizadas por la vía endocítica. (Adaptado de *Rovira et al., 2016*)

4.3. Transporte y transferencia selectiva de micro ARNs mediante vesículas extracelulares

Tanto en condiciones patológicas como fisiológicas, se ha descrito que las VE pueden ser liberadas tras la activación, apoptosis o estrés celular (Simons y Raposo 2009). Este hecho lleva a pensar que existe una respuesta dirigida de las células a los estímulos que reciben, modificando así el tipo de cargo transportado por las VE.

En esta línea, los estudios del grupo del Dr. Lötvall demostraron hace unos años que las VE transportaban ARNs (miARN y ARNm), capaces de llevar a cabo su función una vez internalizados por las células receptoras. Estos resultados pusieron de manifiesto la existencia de una transferencia horizontal de material genético entre células a través de las VE, sugiriendo un importante papel epigenético en la comunicación intercelular (Valadi et al., 2007). Además, otros autores han demostrado las diferencias existentes entre los perfiles de ARN celular y vesicular, mostrando un enriquecimiento selectivo de algunos tipos de ARN pequeños no codificantes en el interior de las VE (Bellingham et al., 2012; van Balkom et al., 2015).

Por lo que respecta a la incorporación selectiva de miARNs en exosomas, ha sido descrita en varios trabajos del grupo del Dr. Sánchez-Madrid. Por un lado, describieron como ciertos miARNs participantes en la sinapsis inmune entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno eran cargados y transportados principalmente por exosomas (Mittelbrunn et al., 2011). Por otro lado, demostraron la existencia de una maquinaria ribonucleoproteica celular que reconocía motivos específicos en la secuencia de los miARNs, controlando así su incorporación y carga en los exosomas (Villarroya-Beltrí et al., 2013).

4.4. Vesículas extracelulares en la hipertensión y microalbuminuria

Cómo se ha expuesto en los apartados anteriores, el cargo transportado por las VE representa una novedosa fuente de información que puede ser utilizada para detectar la presencia de enfermedad, así como para evaluar su progresión y evolución a posibles tratamientos. En el caso de la hipertensión y la microalbuminuria, varios estudios han caracterizado la composición proteica, número y tipo de cargo en modelos animales y pacientes.

La hipertensión arterial a menudo presenta un estado de disfunción endotelial y trabajos recientes han demostrado que las células endoteliales alteradas o dañadas liberan micropartículas endoteliales (MPE) al torrente sanguíneo, constituyendo nuevos marcadores de daño endotelial asociado a varias enfermedades cardiovasculares (Boulanger et al., 2001; Bakouboula et al., 2008; Amabile et al., 2014). En la hipertensión, Preston y colaboradores obtuvieron un aumento en los niveles circulantes de MPE y de origen plaquetario en plasma, asociados a una elevada presión arterial (Preston et al., 2003). Este hallazgo ha sido también confirmado en otras enfermedades que presentan elevada hipertensión y daño vascular como preeclampsia e hipertensión pulmonar (González-Quintero et al., 2004; Marques et al., 2013).

Además de su papel como biomarcadores de lesión, las MPE liberadas por células endoteliales activadas pueden actuar como mediadores y contribuir a la progresión del daño vascular (Leroy et al., 2010; Burger et al., 2011). Varios estímulos como *shear stress* (fuerza de cizalla o corte ejercida por el flujo sanguíneo), inflamación, estrés oxidativo o cambios en los niveles de VEGF, conducen a la activación de las células endoteliales y al aumento de la liberación de MPE (Huang et al., 2010; Ruiz-Hurtado et al., 2014; Berezin et al., 2015). A nivel renal, se ha observado que la activación endotelial que

se produce en el riñón de pacientes hipertensos provoca daño endotelial, el cuál da lugar a la aparición de albuminuria (Rabelink y de Zeeuw 2015). Así, diversos estudios han descrito un aumento de MPE en pacientes hipertensos con microalbuminuria y una correlación inversa de este aumento con el filtrado glomerular renal de los pacientes (Huang et al., 2010; Hsu et al., 2013). En esta misma línea, el trabajo desarrollado por De la Cuesta y colaboradores refleja el aumento de varias proteínas transportadas por VE endoteliales en pacientes hipertensos que desarrollan microalbuminuria *de novo* (de la Cuesta et al., 2017). Estos estudios destacan el impacto del daño endotelial, reflejado en cambios en las VE circulantes, en la aparición y desarrollo de lesión renal en la hipertensión.

Los cambios en los niveles de MPE circulantes también han sido asociados a la función podocitaria, alterando la expresión de VEGF y la endocitosis de albúmina por podocitos (Eyre et al., 2011). En este sentido, en los últimos años varios autores han estudiado la liberación de VE por parte de los podocitos y su relación con la función renal. Kwon y colaboradores han observado que pacientes con hipertensión renovascular presentaban niveles elevados de VE podocitarias en orina (Kwon et al., 2017), mientras que Burger y colaboradores observaron en varios modelos de rata diabética como los niveles de VE podocitarias aumentaban en condiciones hiperglicémicas, prediciendo la aparición de microalbuminuria y daño glomerular (Burger et al., 2014).

Por lo que respecta a los exosomas, varios estudios han relacionado cambios en los niveles exosomales de ARNm y proteínas asociadas a podocitos (WT-1 y CD2AP) con la función renal. El aumento de niveles proteicos y el descenso de ARNm correlacionaba con la presencia de proteinuria y la progresión del daño podocitario (Kalani et al., 2013; Zhou et al., 2013; Lv et al., 2014). Por su parte, estudios del grupo de la Dra. Álvarez-Llamas han demostrado la existencia de un perfil proteico transportado por exosomas asociado a albuminuria en pacientes hipertensos, regulando procesos como la degradación de glicosaminoglicanos que estarían produciendo un remodelado defectuoso de la membrana glomerular basal de los pacientes, pudiendo ser la causa de la hiperfiltración y la albuminuria que desarrollan (Gonzalez-Calero et al., 2017).

Finalmente, trabajos previos de otros autores y de nuestro grupo han demostrado que cambios en los niveles de miARNs transportados por VE y exosomas en particular, pueden ser utilizados como biomarcadores de progresión de microalbuminuria y proteinuria en enfermedades como nefropatía diabética, nefropatía lúpica y fibrosis renal

(Lv et al., 2013; Solé et al., 2015; Perez-Hernandez et al., 2015; Jia et al., 2016). De este modo, se ha propuesto que la monitorización de los niveles de miARNs asociados a VE puede suponer un avance en la detección y seguimiento de enfermedades renales (van Balkom et al., 2011; Fang et al., 2013). Estos estudios refuerzan la idea de que la cuantificación de los niveles de miARNs transportados por VE pueden ofrecer nueva información acerca de los cambios que tienen lugar en el riñón de los pacientes hipertensos con microalbuminuria.

HIPÓTESIS y OBJETIVOS

La hipertensión arterial esencial es la enfermedad crónica más frecuente en las sociedades occidentales y uno de los factores de riesgo cardiovascular primario. Pese a que la reducción de la presión arterial mediante fármacos antihipertensivos tiene efectos renoprotectores, la aparición de daño renal asociado a la hipertensión esencial es frecuente y alrededor del 15-20 % de los pacientes estabilizados desarrolla un aumento en la excreción urinaria de albúmina. Este daño incipiente se define como microalbuminuria (30-300 mg albúmina/día), pudiendo progresar a macroalbuminuria y proteinuria durante el curso de la enfermedad, y se ha utilizado como marcador clínico en la evaluación y seguimiento del riesgo cardiovascular y daño orgánico en la hipertensión.

Las Vesículas Extracelulares (VE) han sido propuestas como un mecanismo de comunicación clave en la transferencia horizontal de información genética entre células. Dentro de los cargos transportados por las VE, los micro ARNs exosomales han adquirido gran relevancia debido a que son transportados selectivamente y tienen la capacidad de regular la expresión génica de las células receptoras. En el riñón, los micro ARNs son indispensables para su desarrollo, homeostasis y mantenimiento de la barrera de filtración glomerular. Además, cambios en los niveles de micro ARNs en diversos biofluidos han sido propuestos como marcadores de lesión y progresión de enfermedad renal en otras patologías como diabetes, síndrome nefrótico e insuficiencia renal crónica.

Por todo ello, nuestra hipótesis de trabajo es que los micro ARNs de exosomas de orina y plasma pueden estar regulando procesos biológicos clave en la aparición y desarrollo de microalbuminuria en la hipertensión esencial. Los niveles alterados de micro ARNs en los pacientes microalbuminúricos pueden ofrecer nueva información acerca de los mecanismos de lesión subyacentes que provocan daño glomerular en la hipertensión, pudiendo convertirse en nuevos biomarcadores diagnóstico y pronóstico de daño orgánico más específicos y sensibles a los utilizados actualmente en la práctica clínica.

Para poder confirmar la hipótesis, en la presente tesis doctoral nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Confirmar la presencia de daño glomerular en los pacientes hipertensos esenciales con microalbuminuria mediante la cuantificación de los niveles de ARNm y proteínas de genes asociados a podocitos en el sedimento urinario. Relacionar estos niveles con la excreción urinaria de albúmina.
2. Aislar, cuantificar y caracterizar distintos tipos de vesículas extracelulares en orina y plasma según su tamaño y composición proteica.
3. Estudiar a nivel cualitativo y cuantitativo la presencia de micro ARNs en las vesículas extracelulares de los pacientes, así como la posible influencia de la microalbuminuria en los niveles de micro ARNs vesiculares.
4. Implementar un protocolo de generación de librerías de *small* ARN individualizadas para secuenciación masiva (NGS) a partir de ARN total extraído de exosomas de plasma, exosomas de orina y plasma.
5. Identificar un perfil de micro ARNs en exosomas de plasma, exosomas de orina y plasma asociados a la presencia de microalbuminuria en pacientes hipertensos esenciales y determinar los procesos biológicos en los que participan.
6. Validar micro ARNs exosomales seleccionados del perfil asociado a microalbuminuria que puedan ser utilizados como biomarcadores diagnóstico y pronóstico en la aparición y desarrollo de daño renal incipiente en la hipertensión.

MATERIAL y MÉTODOS

1. GRUPOS CLÍNICOS DE ESTUDIO

1.1. Población de estudio

La población de estudio principal estuvo compuesta por un total de 52 pacientes (65% de ellos varones y con una edad media de $53,7 \pm 7$ años), citados en las consultas externas del servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico de Valencia. Todos los pacientes fueron diagnosticados de hipertensión arterial esencial siguiendo los criterios recomendados por la *European Society of Hypertension* (Mancia et al., 2014a): hipertensión sistólica > 140 mmHg y/o diastólica > 90 mmHg, con un tiempo de evolución de al menos 5 años. Una vez llegaron a la consulta, a todos los sujetos se les realizó una historia clínica, exploración y análisis bioquímico (glucosa, colesterol, triglicéridos, creatinina). Los parámetros antropométricos se midieron siguiendo procedimientos estandarizados (peso, talla, IMC, perímetro cintura) y se calculó el grado de obesidad y la presencia de diabetes siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La población se dividió en dos grupos basados en la presencia o ausencia de microalbuminuria. De este modo, un total de 24 pacientes componían el grupo de microalbuminúricos ($166,5 \pm 119,7$ mg/L) mientras 28 pacientes no presentaban indicios de albumina en la orina ($4,1 \pm 3,9$ mg/L).

La excreción de albumina en la orina (EUA) se midió mediante ensayos de inmunofelometría (Behring Institute). Para cada paciente, se realizaron dos mediciones correspondientes a la primera micción de la mañana obtenidas con un intervalo menor a una semana. Los datos se normalizaron por la excreción de creatinina y se expresaron como albumina (mg)/creatinina (g). De este modo, la presencia de microalbuminuria (MALB) se definió como ratio albumina/creatinina ≥ 30 mg/g. El coeficiente de reproducibilidad para la medición de EUA en nuestro laboratorio fue del 2-6% (intraensayo) y del 12% (intraindividuo).

En todos los grupos de estudio se estableció un procedimiento que fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia y se realizó siguiendo los postulados de la buena práctica clínica y las normas éticas para la experimentación humana establecidas por la Declaración de Helsinki de 1975 (Rickham,

1964; revisión de 2008). Cada participante dio su consentimiento informado por escrito para formar parte del estudio.

1.2. Población complementaria

Se estudiaron un total de 12 pacientes con nefropatía diabética (82% varones, con edad media de $64,4 \pm 9$ años), citados en el servicio de Endocrinología del Hospital Clínico de Valencia. Todos los pacientes estaban diagnosticados de Diabetes tipo 2 de acuerdo con la guía clínica de la Organización Mundial de la Salud (OMS), con un tiempo de evolución medio de 13 años. Para confirmar su diagnóstico, los pacientes tenían que cumplir al menos uno de los siguientes criterios: niveles de glucosa basal >126 mg/dL, niveles de glucosa medidos al azar >200 mg/dL al menos en dos ocasiones o hemoglobina glicosilada $> 6,5\%$. La presencia de nefropatía diabética con macroalbuminuria se confirmó mediante niveles de EUA elevados (≥ 300 mg/L) y un ratio EUA / creatinina en orina ≥ 300 mg/g, con un tiempo de evolución de al menos 5 años.

2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

2.1. Urinarias

De cada uno de los sujetos de estudio se recogió un volumen de 200 mL de orina en frascos estériles correspondientes a la primera orina de la mañana. La orina se repartió en tubos de 50 mL estériles (Falcon) y se centrifugó a 2.250 g durante 30 minutos a una temperatura de 4°C en una centrífuga de banco (5804 R, Eppendorf). Este primer paso permitió obtener el sedimento urinario o *pellet* celular, al separar las células y fragmentos subcelulares, *cell debris*, del resto de la orina.

2.2. Sanguíneas

Por lo que respecta a las muestras sanguíneas, estas se obtuvieron mediante venopunción periférica entre las 8:00 – 10:00 horas, con el paciente en posición sentada. Se extrajeron dos tubos de cristal de 10 mL con adición del anticoagulante EDTA al 15 % (BD Vacutainer K3E). A partir de 2 tubos de sangre fresca de cada paciente, se separó el plasma centrifugando a 2.250 g durante 15 minutos y a 4°C (5804 R, Eppendorf).

En ambos casos, las muestras fueron inmediatamente procesadas en fresco durante las 2 primeras horas siguientes a su recolección, siguiendo los protocolos de extracción descritos en apartados posteriores.

3. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO EN EL SEDIMENTO URINARIO DE LOS PACIENTES

3.1. Extracción de ARN total

La extracción del ARN total del *pellet* urinario se llevó a cabo utilizando el kit comercial *miRNeasy mini* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este producto se basa en la técnica conocida como “extracción en fase sólida” y utiliza pequeñas columnas que poseen una matriz formada por fibras de silicio y retienen los ácidos nucleicos.

Una vez centrifugada la orina como se ha descrito anteriormente (50 mL a 2.250 g durante 30 minutos a 4°C), se obtiene el sedimento urinario al que se le añaden 700 µL de tampón de lisis Qiazol. Tras homogenizar la muestra, se añadieron 140 µL cloroformo y se volvió a mezclar mediante vórtex. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C (5804 R, Eppendorf). De este modo se obtuvieron 3 fases: acuosa rica en ARN, interfase que contiene DNA y fase orgánica con restos proteicos. Se aisló la fase acuosa en un nuevo tubo y se le añadió 1,5 volúmenes de etanol 100 %. Una vez mezclados los componentes, se cargó todo en la columna y se centrifugó a 10.000 g durante 30 segundos, descartándose el volumen eluido. Este proceso se repitió aplicando dos tampones distintos para lavar la columna. Finalmente, se eluyó el ARN de la columna con 50 µL de solución de elución o agua libre de nucleasas. Posteriormente, la concentración y calidad del ARN se evaluó con un espectrofotómetro (*Nanodrop* 100, Thermo scientific) y la muestra se almacenó inmediatamente a -80°C hasta su utilización.

3.2. Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis del ADN complementario (ADNc) se utilizó el kit *Ready-to-go you-prime first-strand beads* (GE Healthcare). A partir de una cantidad inicial de 300 ng de ARN total, se añadió agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) hasta un volumen final de 34 µL. Una vez diluido el ARN, se añadió 2 µL de *primer* universal y se incubó en el termociclador (9700, Applied Biosystems) a 70°C durante 10 minutos. Posteriormente, se

incubó la dilución en hielo durante 2 minutos y todo el volumen fue traspasado a un tubo de 0,5 mL proporcionado por el kit, el cual contiene dos bolitas con la enzima (*murine* RT) así como el resto de componentes necesarios para la reacción (dNTPs, tampones, estabilizador de ARN). Finalmente, se homogenizó todo el volumen y se incubó en el termociclador 10 minutos a 25°C seguidos de 1 hora a 37°C. Posteriormente, una alícuota de ADNc obtenido fue diluido 1:10 en agua libre de nucleasas y tanto el stock como la dilución fueron congeladas a -20°C.

3.3. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se utilizó para medir la expresión génica relativa de varios genes asociados al podocito. La reacción de RT-qPCR monitoriza la progresión de la amplificación del fragmento correspondiente al gen de interés a tiempo real, midiendo la fluorescencia generada al final de cada ciclo de amplificación. Los cambios en la intensidad fluorescente vienen determinados por las copias del fragmento de interés (amplicón) sintetizadas por la enzima polimerasa en cada ciclo. Se suelen identificar tres fases en la reacción de PCR: una inicial de crecimiento lineal, una fase de crecimiento exponencial donde la fluorescencia es proporcional a la cantidad del producto y una fase final llamada *plateau* o de saturación, en la cuál los sustratos de la reacción enzimática se han consumido. De este modo, los datos se obtienen en la fase exponencial comparando el número de ciclos necesarios en cada muestra para que la señal fluorescente alcance un nivel umbral determinado o *threshold*. Este valor es conocido como Ct (*cycle threshold*) o Cq (ciclo de cuantificación) y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de ADNc presente en la muestra (Bustin et al. 2009).

En nuestro caso, hemos utilizado el sistema *QuantStudio 5* (Applied Biosystems), los ensayos se realizaron en placas de 384 pocillos y para cada reacción se preparó un master mix con 10 µL del kit *Kapa sybr fast* (Kapa Biosystems), que contiene una enzima Taq DNA polimerasa recombinante, un fluróforo *sybr green*, un tampón con cloruro de magnesio y dNTPs, así como una pareja de cebadores o *primers* específicos de cada gen con una concentración final en el pocillo de 0,2 µM. Finalmente, se añadieron 2 µL de ADNc diluido 1:10 y se completó con agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de reacción de 20 µL. Las condiciones de la reacción fueron las mismas para todos los genes, a excepción de la T de extensión (Tabla M1), cada experimento se llevó a cabo

por triplicado calculando el valor medio de Ct de las réplicas mediante el software del aparato (*QuantStudio design & analysis software*, Applied Biosystems). Además, se evaluaron las curvas de fusión para asegurar la amplificación específica del fragmento correspondiente al gen de estudio, así como la inclusión de controles negativos (sin ADNc) para cada pareja de cebadores y un control positivo proveniente de ADNc de riñón humano.

Tabla M1. Condiciones de la RT-q PCR.

Etapa de qPCR	Tiempo	Temperatura
Activación de la enzima	5 min	95°C
Amplificación (40 ciclos)		
Desnaturalización	15 seg	95°C
Extensión	60 seg	60 – 62° C
Curva de fusión	Continua	Incrementos de 0,08 °C / seg hasta 95° C

Los cebadores utilizados, se diseñaron *de novo* en nuestro laboratorio a partir de las secuencias almacenadas en la base de datos *Gene Bank* del NCBI y fueron sintetizados por la empresa Sigma-Aldrich. Los parámetros que se tuvieron en cuenta para su diseño se resumen en la Tabla M2. Para ello se utilizó el software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) y se procedió a utilizar la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para comprobar la hibridación específica de los cebadores obtenidos con la región de ADNc correspondiente a cada gen. Para aumentar la especificidad, al menos uno de los cebadores de cada pareja se diseñó en la zona de unión de dos exones diferentes. Finalmente, también se comprobó en la base de datos *Ensembl* que las regiones de hibridación no contenían polimorfismos, SNPs, ni tampoco inserciones/deleciones. Los detalles de cada pareja de cebadores pueden ser consultados en la Tabla M3.

Tabla M2. Características de los cebadores utilizados.

Parámetros	Características cebadores
Tamaño cebador	18 – 24 pb
Temperatura de fusión (T_m)	60 – 62°C (dependiendo del gen)
Máxima diferencia de T_m (dentro de cada pareja)	1,5 °C
Tamaño amplicon	95 – 150 pb

La expresión génica relativa de los genes asociados al podocito se obtuvo mediante el cálculo de ΔCt . De este modo, el valor inicial de Ct de cada muestra para cada gen se

normalizó con respecto al valor medio de Ct correspondiente a los dos genes de expresión constitutiva, β -actina y β -2-microglobulina, para esa muestra (Pfaffl, 2001). Una vez obtenido ΔCt , se calculó $\Delta\Delta Ct$ [ΔCt grupo enfermedad – ΔCt grupo control] para poder comparar el nivel de expresión relativa para cada gen entre los grupos clínicos del estudio. Finalmente, se obtuvo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se expresó la diferencia entre grupos como *fold-change* o cambio de expresión en número de veces.

Tabla M3. Cebadores utilizados en este estudio.

Gen (Proteína)	Nº de transcrito	Secuencia nucleotídica	T. Amplicón
PODXL (Podocalixina)	NM_001018111.2	F: TTACAGCGTCATCGGTTATCTC R: CATGGTCTCTGGCAGGGTAG	146 pb
NPHS1 (Nefrina)	NM_004646.3	F: TATTCCCGAGGTTTCACAGG R: GTGTCACCCTGGCTGTGG	128 pb
NPHS2 (Podocina)	NM_014625.3	F: AGGAAGGTACCAAATCCTCCG R: TACTCTTGTACAACCTTTACGCAGAAC	124 pb
CD2AP (CD2AP)	NM_012120.2	F: AGGCATGGGAATGTAGCAAG R: TGACGCTTCTTGGTCTTCTTC	116 pb
SYNPO (Sinaptopodina)	NM_007286.5	F: AGGGAGGACCTAGCAGACGTT R: GTGGCTCTCCAAGGTGAACTC	144 pb
WT1 (Wilm's tumor-1)	NM_024426.4	F: TTCGCAATCAGGGTTACAGC R: AATGAGTGGTTGGGGAAGT	97 pb
AQP1 (Acuaporina-1)	NM_198098.2	F: GGACACCTCCTGGCTATTGAC R: AGAAAATCCAGTGGTTGCTGAAG	103 pb
AQP2 (Acuaporina-2)	NM_000486.5	F: ACCTCCTTGGGATCCATTAC R: CGATCCAGAAGACCCAGTG	105 pb
ACTB (β -Actina)	NM_001101.3	F: TGGAGAAAATCTGGCACCAC R: CATGATCTGGGTCATCTTCTCG	125 pb
B2MG (β 2Microglobulina)	NM_004048.2	F: TCCAGCGTACTCCAAAGATTC R: GTCAACTTCAATGTCGGATGG	113 pb

4. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES PROTEICOS EN EL SEDIMENTO URINARIO DE LOS PACIENTES

4.1. Extracción y determinación de la cantidad de proteínas del sedimento urinario

Los extractos proteicos procedentes del sedimento urinario y de las VE se obtuvieron mediante la adición del tampón de lisis RIPA (25 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% *sodium deoxycholate*, 0,1% SDS; Thermo scientific) suplementado con inhibidores de proteasas (2 µg/ml leupeptina, 20 ng/ml aprotinina; Sigma-Aldrich). Tras la adición del tampón, la solución se mezcló por vórtex a máxima velocidad durante 1 minuto y se dejó en hielo 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 13.000 rpm durante otros 10 minutos a 4°C (5415R, Eppendorf), y se aisló el sobrenadante que contiene la fracción proteica soluble. Además, se prepararon alícuotas de 150 µL para la determinación de la concentración proteica antes de congelar los extractos a -80°C.

La determinación cuantitativa de proteínas de cada alícuota se realizó por el método espectrofotométrico descrito por Lowry y colaboradores (1951). En nuestro caso, utilizamos el kit *Total protein, Micro Lowry, Peterson's modification* (Sigma-Aldrich) y medimos la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 640 nm. También se preparó una curva de calibración utilizando concentraciones conocidas de albúmina bovina (BSA) como referencia. De este modo, los valores de absorbancia de cada muestra fueron interpolados en la curva de calibración y la concentración se calculó mediante un ajuste potencial.

4.2. Electroforesis, transferencia e inmunodetección

Para cada muestra se utilizaron 20 µg de extracto proteico que se resolvieron mediante una electroforesis, utilizando geles de poliacrilamida en gradiente NuPAGE Novex Mini Gel Bis Tris 4-12% (Invitrogen). Cada muestra (20 µg) se llevó a un volumen final de 20 µL que incluyó tampón de carga (*NuPAGE LDS sample buffer 4X*, Invitrogen), muestra y agua destilada hasta completar el volumen final. Inmediatamente después las muestras se calentaron 10 minutos a 70°C en un bloque termostático antes de ser cargadas en el gel. Los geles se introdujeron en una cubeta de electroforesis vertical *XCell sure lock mini cell* (Invitrogen) con el tampón de electroforesis *NuPAGE MES running buffer* (20X) (Thermo Fisher scientific). A continuación, las muestras se cargaron en los pocillos del gel y se utilizó como patrón un marcador de peso molecular con un rango de

3 – 188 KDa, *SeeBlue Plus2 pre-stained protein standard* (Thermo Fisher scientific). Por último, las condiciones de la electroforesis fueron un voltaje constante de 200 V y 120 mA durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Una vez separadas las proteínas en los geles, se transfirieron a una membrana de PVDF utilizando el módulo de transferencia *XCell II Blot Module* (Invitrogen). Las condiciones de la transferencia fueron de 30 V y 170 mA durante 1 hora, seguido de 10 minutos a 110 mA. Posteriormente, se incubó la membrana durante toda la noche a 4°C en una solución con BSA al 1% en un tampón TBS con Tween 20 al 0,05% (v/v) para bloquear los sitios de unión inespecíficos y reducir una posible unión no específica del anticuerpo posterior.

Tras el bloqueo de la membrana, se sustituyó la solución por otra que contenía el anticuerpo primario en una dilución apropiada en TBS-Tween (Tabla M4). Esta incubación se llevó a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Seguidamente, se lavó la membrana 3 veces durante 5 minutos en tampón TBS-Tween 20 al 0,05% y se incubó con un anticuerpo secundario monoclonal anti-conejo, cobaya o ratón, dependiendo del primario utilizado en cada caso, conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich) y diluido 1:20.000 en TBS-Tween 20 + Nonidet P40 al 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación, excepto para nefrina que se diluyó a 1:3000. Posteriormente, se volvió a lavar la membrana 3 veces durante 5 minutos en TBS-Tween 20 al 0,05%, se repitió el proceso lavando sólo con TBS y se llevó a cabo el revelado de bandas al incubar la membrana en oscuridad con una dilución del colorante *NBT/BCIP buffered substrate tablets* (Sigma-Aldrich) en agua destilada (1 pastilla / 10 mL) durante aproximadamente 20 minutos.

Finalmente, tras una serie de lavados con agua destilada para detener la reacción colorimétrica, se procedió al secado de las membranas, digitalización y cuantificación de las bandas de proteínas obtenidas. Para ello se utilizó el sistema *Gel Capture* (v. 4.30) y el programa *TotalLab 100* (v.2008).

Tabla M4. Anticuerpos primarios utilizados.

Proteína	Kda	Especie (tipo)	Casa comercial	Dilución
<i>Podocalixina</i>	165	Ratón (mc)	Santa Cruz	1:300
<i>Nefrina</i>	185	Cobaya (mc)	Acris	1:500
<i>Podocina</i>	42	Conejo (mc)	Abcam	1:1000
<i>CD2AP</i>	80	Conejo (pc)	Sigma-Aldrich	1:400
<i>Sinaptopodina</i>	110	Ratón (mc)	Progen Biotechnik	1:300
<i>Wilm's tumor-1 (WT1)</i>	47	Conejo (pc)	Abcam	1:500
<i>Acuaporina-1</i>	28	Conejo (pc)	Millipore	1:600
<i>β-Actina</i>	42	Ratón (mc)	Sigma-Aldrich	1:2000

KDa: Kilodaltons; mc: monoclonal; pc: policlonal

5. AISLAMIENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Para el aislamiento de las vesículas extracelulares presentes en los biofluidos hemos utilizado una técnica basada en centrifugaciones diferenciales. Con esta metodología podemos separar los componentes de una solución según su coeficiente de sedimentación, que viene dado por el tamaño y la masa de cada partícula, así como la viscosidad del medio donde está. Así, tras una primera centrifugación de banco, pasamos a realizar el resto de ultracentrifugaciones con la ultracentrífuga *Optima L 100K* (Beckman Coulter) y los rotores de ángulo fijo *70 Ti* y *70.1 Ti* (Beckman Coulter). En todos los casos se centrifugó a 4°C, utilizando una aceleración máxima y no se utilizó sistema de frenado. Las velocidades se expresan en g media (g_m), teniendo así en cuenta el ángulo del rotor en su parte central. Se utilizaron tubos de 10 mL para el rotor *70.1 Ti* y botellas de 26 mL para el *70 Ti*, ambos de policarbonato, y se compensó su peso mediante una balanza de precisión *EWJ* (Kern) antes de comenzar cada ultracentrifugación.

5.1. Aislamiento de vesículas extracelulares en orina

Se empleó un volumen de 100 mL de orina libre de células por paciente para aislar las vesículas extracelulares (VE) siguiendo un protocolo adaptado de Vlassov et al., 2012. De este modo, tras la primera centrifugación de banco se añadieron 4,2 mL de una

solución inhibidora de proteasas (Aprotinina 0,3 μ M, Leupeptina 1 μ M, Bestatina 130 μ M, EDTA 1 mM, AEBSF 2 mM; Sigma-Aldrich). Posteriormente, todo el volumen se transfirió a cuatro botellas de policarbonato (Beckman Coulter) y se centrifugó a 19.000 g_m durante 45 minutos a 4°C. Tras este primer paso obtenemos un *pellet* rico en microvesículas (MV) y un sobrenadante que contendrá la fracción exosomal. Así pues, centrifugamos el sobrenadante a 120.000 g_m durante 70 minutos y obtuvimos el *pellet* correspondiente a los exosomas (Exo). Como consecuencia del aumento en la velocidad de centrifugación se produce una co-precipitación proteica compuesta básicamente por filamentos de uromodulina, glicoproteína rica en la orina también conocida como *Tamm-Horsfall* (THP). Debido a ello, las muestras de Exo fueron resuspendidos en 100 μ L de PBS filtrado a 0,2 μ m e incubados 10 minutos a 37°C con una solución de Ditiotretitol (DTT) a 200 mg/mL (agente reductor que rompe los puentes disulfuro formados en los residuos de cisteína) (Gonzales et al., 2009). Tras la incubación, la reacción se detuvo añadiendo 5 mL de PBS filtrado a 4°C y se volvió a ultracentrifugar a 120.000 g durante 70 minutos, obteniendo así el *pellet* definitivo de exosomas (Figura M1).

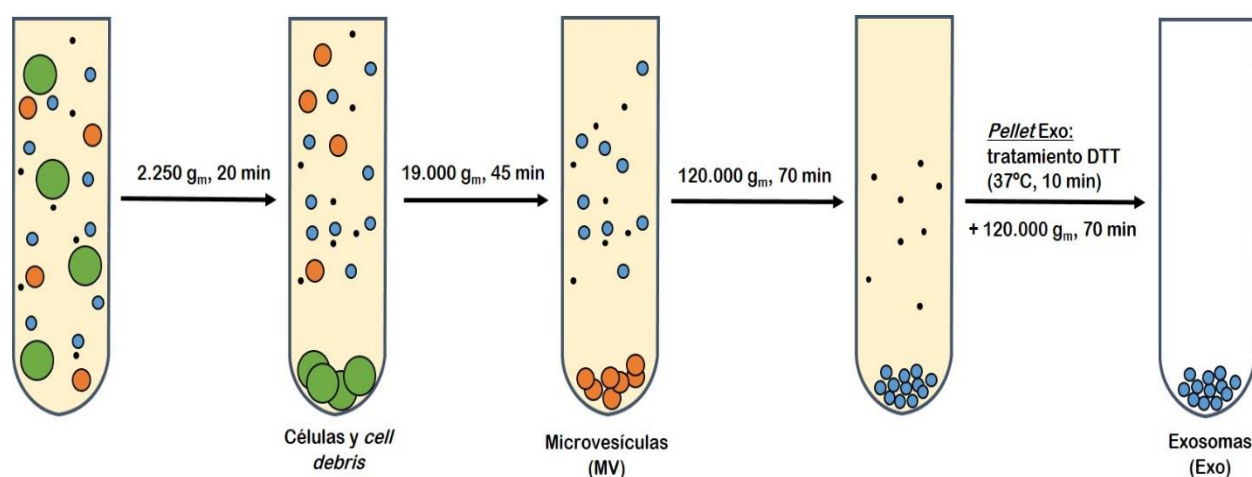


Figura M1. Protocolo de centrifugación diferencial utilizado en el laboratorio. A partir de rondas consecutivas de centrifugaciones podemos obtener vesículas de menor diámetro y con menor coeficiente de sedimentación. Los sobrenadantes fueron trasvasados a un nuevo tubo para seguir con el aislamiento de VE, excepto en el último paso que fueron descartados. Los puntos negros representan complejos de proteínas solubles que, mayoritariamente, permanecen en el sobrenadante descartado.

DTT: Ditiotretitol; g_m : velocidad g media; min: minutos; VE: vesículas extracelulares.

5.2. Aislamiento de vesículas extracelulares en plasma

El proceso para aislar VE de plasma fue muy similar al descrito anteriormente para la orina. Debido a su elevada viscosidad y el impacto que esta propiedad puede tener en el posterior aislamiento de VE, 2 mL de plasma fresco fueron diluidos 1:3 en PBS filtrado

a 0,2 μm (Momen-Heravi et al., 2013). Posteriormente se produjo la primera ultracentrifugación a 19.000 g_m durante 45 minutos y se obtuvieron las MV. A continuación, se obtuvo el *pellet* de exosomas (120.000 g_m , 70 minutos), que se resuspendió directamente en 2 mL de PBS filtrado y se volvió a centrifugar. De este modo se obtuvo el *pellet* rico en exosomas final y se procedió a la preparación de alícuotas previo a su congelación a -80°C .

Para ambos biofluidos, los *pellets* de VE se resuspendieron en 200 μL de PBS filtrado a 0,2 μm y se realizaron alícuotas en tubos estériles sin RNasas antes de congelar a -80°C . La distribución se llevó a cabo de la siguiente forma: 100 μL para extraer RNA, 70 μL para extracción proteica, 30 μL para estudios de caracterización (microscopía electrónica, qNano). También se guardó una alícuota del sobrenadante libre de Exo, tras centrifugar a 120.000 g_m , para confirmar que no había restos de VE y el protocolo de aislamiento era el adecuado.

6. CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

6.1. Estudio de Microscopía electrónica de transmisión

Como se ha introducido en este trabajo, una de las características que permite clasificar y discernir entre Exo y MV es su tamaño. Los métodos de tinción más utilizados en microscopía electrónica de transmisión, por su rapidez y sencillez, son los denominados de “Tinción negativa”. Este tipo de tinción permite visualizar vesículas con forma redondeadas donde se aprecia claramente la bicapa lipídica característica de las VE (Vlassov et al., 2012).

En nuestro caso, se utilizó un contraste con Acetato de Uranilo al 2% partiendo de 20 μL de una suspensión de Exo o MV en PBS. Se depositó una gota de esta suspensión en una placa Petri y a continuación, se puso una rejilla de cobre recubierta con una película de Carbón-Formvar encima. Tras incubar 5 minutos, se cogió la rejilla con unas pinzas y se puso encima de una suspensión de acetato de uranilo al 2%, incubando durante 3 minutos en oscuridad. Tras lavar brevemente la rejilla en una gota de PBS, se secó con mucho cuidado y se introdujo en el microscopio electrónico de transmisión (Phillips CM-10), equipado con una cámara digital *Soft image system* (Olympus) y utilizando el software

de adquisición de imágenes iTEM (Olympus). Para realizar el conteo de vesículas y su tamaño medio se utilizaron 2 muestras de pacientes para cada tipo de VE. De este modo, se analizaron 5 micrografías de cada muestra midiendo el tamaño de al menos 250 vesículas. Los resultados se obtuvieron mediante el programa de análisis de imagen *Image J*, hallando así su media y desviación típica.

6.2. Análisis proteico mediante western blot

Las VE también pueden ser caracterizadas en base a proteínas específicas que aparecen enriquecidas tanto en su espacio luminal como formando parte de sus membranas lipídicas. Se escogieron CD9, proteína de membrana de la familia de las tetraspaninas, y TSG101, que forma parte del complejo ESCRT-1, clave en la biogénesis de los cuerpos multivesiculares que contienen los exosomas (Lu et al., 2003). Además, también se utilizaron otros marcadores no exosomales que podrían indicar una posible “contaminación” de nuestras preparaciones de VE con otros fragmentos subcelulares. Por ello se analizó la presencia de Calnexina (marcador endosomal), GM-130 (aparato de Golgi) y Nucleoporina-62 (núcleo). Todo el proceso de extracción proteica, cuantificación, electroforesis e inmunodetección se llevó a cabo de la forma descrita en el apartado 4. La cantidad inicial cargada por muestra fue de 15 µg. Los detalles de los anticuerpos utilizados se encuentran descritos en la Tabla M5.

Tabla M5. Anticuerpos primarios utilizados para la caracterización proteica de EV.

Proteína	KDa	Especie (tipo)	Casa comercial	Dilución
CD9	25	Ratón (mc)	Santa Cruz	1:300
TSG-101	45	Ratón (mc)	Abcam	1:500
Calnexina	95	Conejo (pc)	Abcam	1:500
GM-130	112	Conejo (mc)	Abcam	1:1200
β-Actina	42	Ratón (mc)	Sigma-Aldrich	1:2000
Nucleoporina-62	53	Conejo (pc)	Abcam	1:500

KDa: Kilodaltons; mc: monoclonal; pc: policlonal

6.3. Perfil de tamaños y cuantificación mediante Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS)

Tradicionalmente se han llevado a cabo métodos de cuantificación indirecta basados en la cantidad de marcaje proteico específico presente en las preparaciones. Sin embargo, esta metodología no tiene en cuenta la cantidad de proteína específica medida por EV, los agregados proteicos con otras proteínas que puedan contaminar la cantidad total, etc. De este modo, en los últimos años han aparecido nuevos métodos para poder estudiar el tamaño y la cantidad de las distintas poblaciones de VE presentes en los fluidos biológicos de una forma directa (Maas *et al.*, 2014).

Uno de ellos es *qNano gold* (Izon), que utiliza la tecnología TRPS. De este modo, el funcionamiento del aparato se basa en el movimiento de las vesículas presentes en la muestra a través de una membrana elástica que contiene una apertura en su parte central (nanoporo) y separa dos cámaras fluidicas. La cámara fluidica inferior está compuesta por un tampón con electrolitos mientras que la superior se rellena con la muestra a estudio y se limpia tras pasar cada muestra. Una vez fijada la apertura del poro recomendada, el aparato aplica un voltaje que nos permite alcanzar una línea de corriente base de entre 110 -130 nA (Figura M2).

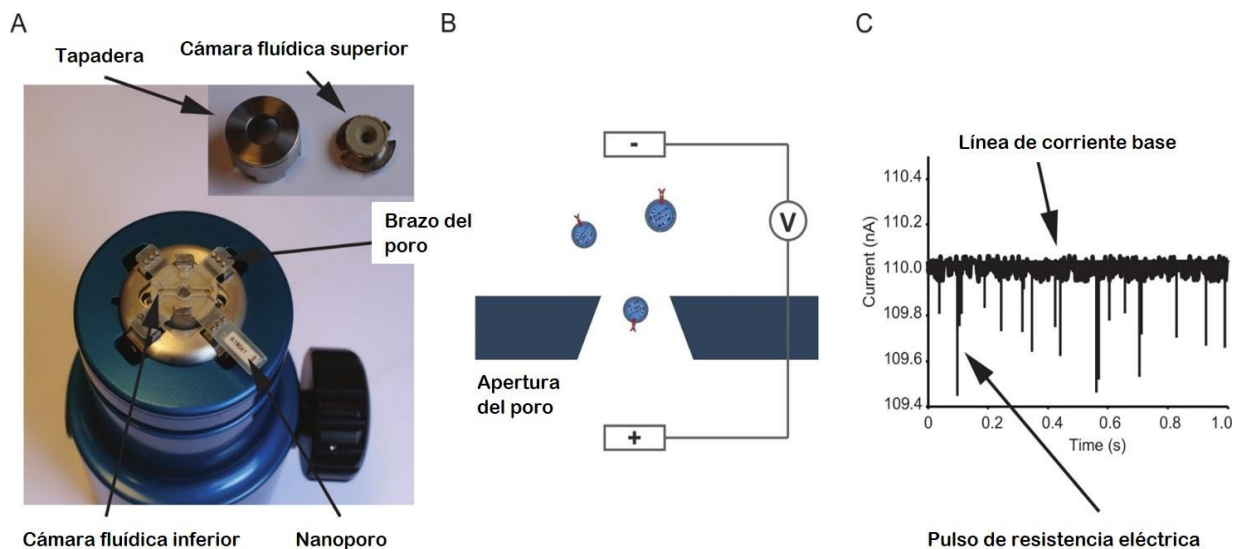


Figura Z. Principio de funcionamiento de qNano y de la tecnología TRPS. A) Fotografía del instrumento en el que se observa el nanoporo ya acoplado sobre la cámara fluidica inferior. La tapadera se sitúa sobre la cámara fluidica superior para evitar interferencias en la corriente eléctrica. B) Principio de acción de TRPS. Aplicando un voltaje determinado en un tampón conductor se establece una corriente eléctrica a través del poro. Cuando una vesícula sin carga pasa a través del poro, el flujo iónico se altera produciéndose un breve pulso de resistencia a la corriente. La magnitud del pulso será proporcional al tamaño de la vesícula. C) Electroferograma que representa los pulsos obtenidos tras el paso de varias vesículas a través del poro. (Adaptado de Maas *et al.*, 2014).

Así, cada vez que una VE pase por el poro, bloqueará la corriente momentáneamente y se producirá un pulso de resistencia (*resistive pulse*) proporcional al tamaño de la vesícula (Kozak et al., 2012). La técnica se basa en que la duración de este bloqueo puede ser usada para examinar el potencial z de las vesículas, que viene dado por propiedades como su forma y carga. Además de la magnitud del pulso de resistencia, la tasa de pulsos en el tiempo nos ofrece información sobre la concentración de VE en la muestra.

En nuestro caso, se ha utilizado el método clásico descrito por varios autores, basado en comparar nuestra muestra con un set de bolas de calibración que presenta un tamaño y concentración conocidas y que permiten así hallar la concentración de VE en la muestra (Maas et al., 2014). De este modo, para los exosomas se utilizaron 40 µL de una dilución (1:100 – 1:200) y un nanoporo NP150, que posee un rango de sensibilidad teórico para vesículas de 70 a 420 nm y que se acopló a las bolas de calibración CPC 200 (media 200 nm). Por su parte, para las microvesículas se utilizó el mismo volumen y rango de diluciones y un nanoporo NP400 con bolas de calibración CPC 400 (media 400 nm). Para ambos tipos de VE se llevó a cabo una medición de al menos 500 eventos, calculándose la concentración por mL, así como la media y la moda de la variable tamaño. Se midieron VE de al menos 5 pacientes y controles provenientes de orina y plasma.

7. ANÁLISIS DE MICRO ARNs PRESENTES EN LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES URINARIAS

7.1. Extracción de ARN total

La extracción del ARN total de las VE se llevó a cabo utilizando el kit *Total exosome RNA and protein isolation* (Invitrogen). Es un kit basado en una extracción orgánica con una solución fenol-ácido:cloroformo y la utilización de columnas de fibras de silicio que retienen los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa. El volumen de partida fue de una alícuota de 100 µL de suspensión de VE aisladas de orina o plasma. Por otro lado, en lo que respecta a la elución final del ARN, esta se realizó con 100 µL totales de agua libre de endonucleasas, en dos tandas de 50 µL, calentada previamente a 95°C.

Posteriormente, se cuantificó la cantidad de ARN y su pureza mediante el cociente de absorbancia 260/280 con el espectrofotómetro Nanodrop 100. No obstante, debido a la escasa cantidad de ARN total presente en las VE comparado con el intracelular y sumado a la diferencia en los tipos de ARN predominantes en las VE, se utilizó un sistema alternativo mediante electroforesis capilar en chip *Bioanalyzer 2100* (Agilent). Así, siguiendo las recomendaciones del organismo internacional *ISEV (International Society for Extracellular Vesicles)*, utilizamos este sistema que aumenta la sensibilidad y permite examinar el tamaño del ARN extraído de las VE (Mateescu et al., 2017). Finalmente, el ARN fue almacenado a -80°C.

7.2. Control de normalización: spike-in sintético cel-miR-39

Debido a la variabilidad existente entre muestras biológicas por su contenido lipídico y proteico, se puede ver afectada la eficiencia de la extracción de ARN e introducir potenciales inhibidores de la reacción de RT-qPCR posterior. Para normalizar esta variabilidad y la que se da en el propio procedimiento de extracción, se introdujo un miARN sintético no humano (*C. elegans* miR-39, 5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3'; Qiagen) en un paso determinado de la extracción de ARN en todas las muestras (Mitchell et al., 2008). Tras añadir el tampón desnaturalizante del kit e incubarlo durante 5 minutos para inactivar las endonucleasas, se pipetearon 3,5 µL de cel-miR-39 a una concentración de $1,6 \times 10^8$ copias / µL en cada muestra. De esta manera, un número de copias conocido de cel-miR-39 siguió todo el proceso desde la extracción inicial hasta la cuantificación final mediante RT- q PCR (Kroh et al., 2010).

7.3. Síntesis de ADN complementario

Se realizó una aproximación por volumen de eluido, utilizando 5 µL de ARN total, teniendo en cuenta que en todos los pacientes el volumen inicial de plasma y orina para aislar las VE fue el mismo, así como el tipo de extracción y volumen de elución (Mitchell et al., 2008).

La retrotranscripción para convertir miARN en ADNc se llevó a cabo utilizando el kit *TaqMan miRNA reverse transcription* (Applied Biosystems) que se utilizó junto a sondas específicas para cada miARN que se quiso cuantificar (Figura M3). Estos cebadores específicos para cada miARN forman un lazo en el extremo 3' del miARN. En nuestro caso, se utilizaron los siguientes ensayos *TaqMan* para miARN humanos: miR-335* (ID

002185) y miR-146a (ID 000468) y el correspondiente al *spike-in* cel-miR-39 (ID 000200). Se preparó un master mix individual para cada miARN con: 0,15 µL de dNTPs a 100 mM, 1 µL de transcriptasa inversa (enzima *multiscribe*), 1,5 µL de buffer 10X, 0,19 µL de inhibidor de RNasa, 4,16 µL de agua libre de nucleasas y 3 µL del primer específico de cada miARN a 5X. Se utilizaron placas de 96 pocillos y se dispensaron 12 µL de master mix en cada pocillo, añadiéndose finalmente 5 µL del ARN total de cada muestra. Un control negativo sin muestra fue preparado para cada ensayo. Finalmente, cada placa se mantuvo en hielo durante 5 minutos y, seguidamente, se programaron las condiciones de la reacción en el termociclador (*Gene Amp 9700*, Applied Biosystems) que fueron las siguientes: 16°C durante 30 minutos, 42°C durante 30 minutos y 85°C durante 5 minutos. El ADNc fue congelado a -20°C hasta que se realizó la RT-qPCR.

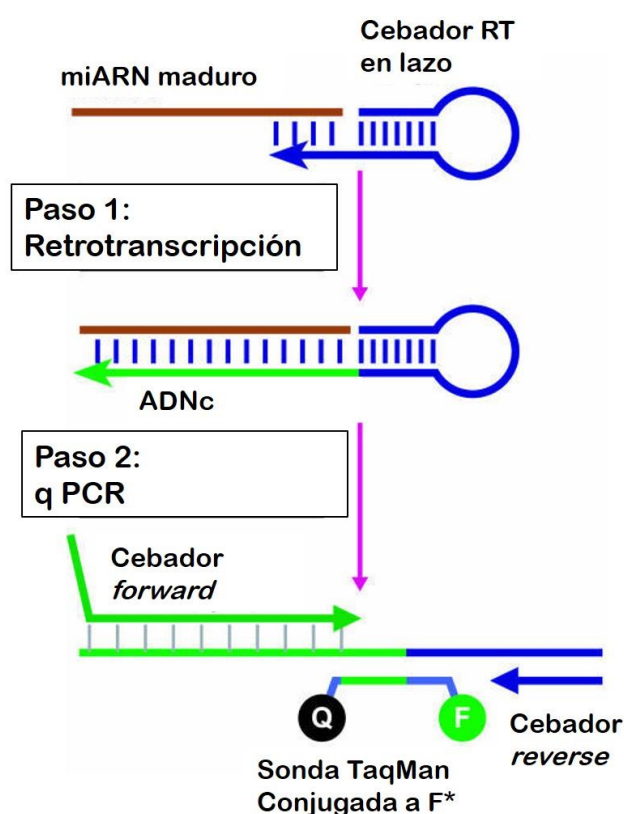


Figura M3. Mecanismo de acción de los ensayos TaqMan para cuantificar miARN mediante RT- qPCR. El miARN maduro de interés es retrotranscrito a ADNc mediante la unión de un cebador en forma de lazo al extremo 3' (paso 1). Durante la qPCR en tiempo real, la polimerasa amplifica el ADNc, hidrolizando así la sonda específica que contiene el fluoróforo. De este modo, el fluoróforo (F) queda separado del *quencher* (Q) y se genera fluorescencia cada vez que se forma una nueva hebra de ADNc. (Adaptado de *Chen et al.*, 2005).

7.4. Cuantificación de micro ARNs mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) y sondas *TaqMan*

Para cuantificar el ADNc producido en la retrotranscripción se llevaron a cabo RT-qPCR en placas de 384 pocillos. Se incluyeron dos ensayos en cada placa de reacción, uno de los miARN a estudio junto al *spike-in* cel-miR-39 para poder normalizar los

resultados obtenidos. En este caso, se utilizó un master mix ya preparado para utilizar con las sondas *TaqMan* (*PCR universal master mix II*, Applied Biosystems) que contenía todo lo necesario para poder amplificar la molécula de ADNc generada en el paso anterior. A medida que se produce la amplificación exponencial durante la reacción de qPCR, la polimerasa hidroliza la sonda *TaqMan*, separando los dos fluoróforos que esta contiene y emitiendo señal fluorescente (Figura M3). Los volúmenes de reacción fueron los siguientes: 10 µL de master mix, 1 µL de sonda específica para cada ensayo de miARN, 7,67 µL de agua libre de nucleasas y, finalmente, 1,33 µL de ADNc. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado y se incluyeron controles negativos tanto para la retrotranscripción (sin ARN inicial) como para la RT-qPCR (sin ADNc). Se utilizó el sistema *LightCycler 480 II* (Roche) siguiendo el protocolo para los ensayos *TaqMan* (Tabla M6).

Tabla M6. Condiciones RT- q PCR para ensayos *TaqMan*.

Etapas de qPCR	Tiempo	Temperatura
Activación de la enzima	10 min	95°C
Amplificación (40 ciclos)		
Desnaturalización	15 seg	95°C
Extensión	1 min	60°C

7.5. Normalización de resultados usando spike-in cel-miR-39

La cuantificación relativa de cada miARN a estudio fue obtenida determinando su valor Ct normalizado. Los valores de Ct correspondientes a cada réplica fueron obtenidos mediante el software del aparato (LC 480 II SW v.1.5) quedando fijado el valor umbral o *threshold* de forma automática.

No existe consenso en cuanto a la utilización de una referencia interna de expresión constitutiva para normalizar valores de miARNs cuantificados por RT-qPCR (Meyer 2010; Roberts 2014). Por ello, para normalizar los datos entre las muestras se empleó un procedimiento de normalización por la mediana del *spike-in* (Mitchell et al., 2008). Este procedimiento consiste primero en cuantificar el valor de Ct para cel-miR-39 de cada muestra individual, calculando después la mediana del valor Ct para cel-miR-39 de todas las muestras. De este modo, el valor Ct normalizado para el miARN de interés se calculó con la siguiente fórmula:

Valor Ct normalizado para miARN en la muestra = media Ct inicial obtenida - [(media Ct cel-miR-39) - (mediana Ct cel-miR-39 todas las muestras)]

Una vez hallado este valor de Ct normalizado, se utilizó en el cálculo de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ y se pudo comparar el nivel de expresión relativa de cada miARN entre muestras, expresado como *fold-change*.

8. SECUENCIACIÓN MASIVA DE MICRO ARNs PRESENTES EN EXOSOMAS Y PLASMA

A partir del ARN total extraído de las VE se generaron librerías o genotecas de ARN pequeños, conocidos como fracción *small RNA*. Esta población de ARN se caracteriza por tener un tamaño < 200 pb y, generalmente, es ARN no codificante para proteína pero determinante en la regulación génica. Este trabajo se ha centrado principalmente en la secuenciación de los miARN transportados por las VE, siguiendo el flujo de trabajo mostrado en la Figura M4.



Figura M4. Esquema del protocolo desarrollado para secuenciar miARNs transportados por las vesículas extracelulares.

8.1. Preparación de las librerías de ARN pequeños (ARNp)

La generación de las librerías se llevó a cabo empleando el kit *CleanTag Small RNA library preparation* (TriLink biotechnologies). Este kit utiliza unos adaptadores 5' y 3' modificados químicamente que disminuyen la formación de dímeros inespecíficos y además, permite trabajar con mínimas cantidades de ARN inicial, aspecto clave para cuantificar los miARN transportados por las VE (Figura M5). Se utilizó el protocolo para muestras con muy poco ARN de partida (< 10 ng totales), diluyendo ambos adaptadores 1:4 en agua estéril sin endonucleasas. Todas las incubaciones y PCR se llevaron a cabo con un termociclador de 96 pocillos 9700 (Applied Biosystems).

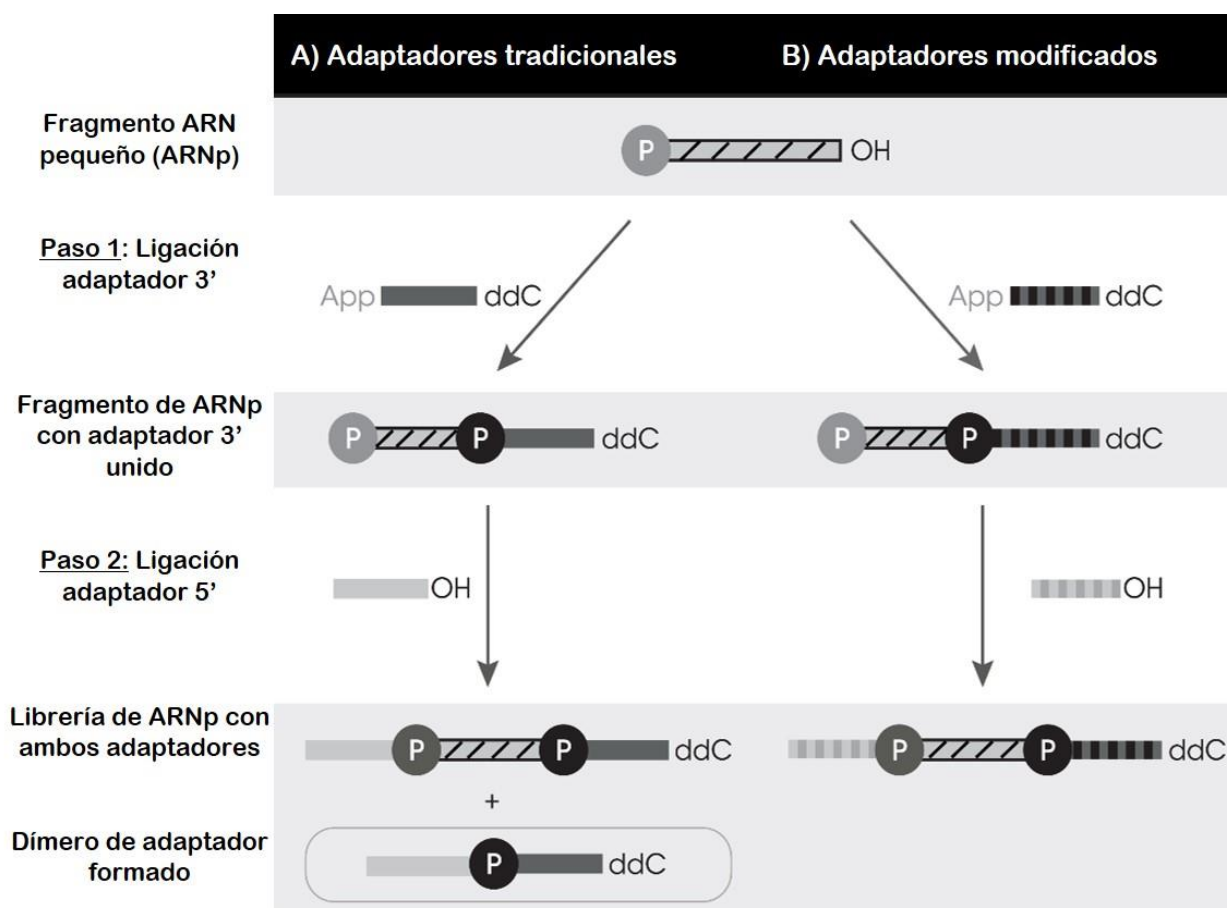


Figura M5. Comparación de la preparación de librerías de ARN pequeños utilizando adaptadores modificados *CleanTag*. A) Proceso clásico de ligación. B) Proceso alternativo con adaptadores modificados químicamente. (Adaptado de *Shore et al., 2016*).

8.1.1. Ligación de los adaptadores 3' y 5'

En este paso inicial se unen los adaptadores a los extremos de los ARNp. Este proceso es clave porque sólo las moléculas de ARN que ligan los dos adaptadores serán retrotranscritas a ADNc, amplificadas y posteriormente secuenciadas.

A partir de 2 µL de ARN inicial desnaturalizado a 70°C durante 2 minutos, se añadió 1 µL de tampón 1X, 1 µL inhibidor de RNasa murina, 1 µL de ARN ligasa T4 truncada y 1 µL de adaptador, dilución 1:4, 3' *CleanTag* (5'-TGGAATTCTCGGGTGCCAAGGC-3'). Después, se incubó a 28°C durante 1 hora seguido de 20 minutos a 65°C para inactivar la enzima. A continuación, se preparó un master mix muy similar utilizando otra ligasa T4 truncada y en este caso el adaptador, dilución 1:4, 5' *CleanTag* (5'-GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC-3), incubándose de la misma forma.

8.1.2. Retrotranscripción (RT) a ADNc

En este paso las moléculas de ARN que hayan unido sus adaptadores son retrotranscritas a ADNc. Para ello se utilizó el volumen proveniente del paso 2 al que se le añadieron el cebador RT (5'- GCCTTGGCACCCGAGAATTCCA -3'), agua desionizada, tampón 5X, dNTPs, DTT, inhibidor RNasa murina y la enzima *Protoscript II* RT. Todo el volumen fue incubado a 50°C durante 1 hora.

8.1.3. Amplificación del ADNc

En este último paso se procede a la amplificación de las moléculas de ADNc formadas anteriormente. Para ello se utilizó todo el producto de la RT al que se añadió una polimerasa de alta fidelidad, un cebador *Forward* idéntico para todas las muestras (5'- AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGA -3') y un cebador *Reverse* específico para cada muestra (5'- CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAG AATTCCA -3'). Este cebador contiene una secuencia específica de 6 pb (subrayada) que se encuentra en el interior del cebador y se conoce como índice. Se utilizaron 24 índices distintos (Set 1 y set 2, compatibles con la tecnología de Illumina, *Trilink biotechnologies*) que nos permitieron identificar a cada muestra en la posterior secuenciación (Tabla M7).

Tabla M7. Secuencia específica de los índices utilizados.

SET 1		SET 2	
Índice	Secuencia	Índice	Secuencia
01	CGTGAT	13	TTGACT
02	ACATCG	14	GGAAC
03	GCCTAA	15	TGACAT
04	TGGTCA	16	GGACGG
05	CACTGT	17	CTCTAC
06	ATTGGC	18	GCGGAC
07	GATCTG	19	TTTCAC
08	TCAAGT	20	GGCCAC
09	CTGATC	21	CGAAAC
10	AAGCTA	22	CGTACG
11	GTAGCC	23	CCACTC
12	TACAAG	24	GCTACC

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 98°C durante 30 segundos, seguidos de 18 ciclos de amplificación (98°C x 10 segundos; 60°C x 30 segundos; 72°C x 15 segundos) y 72°C durante 10 minutos al final.

8.2. Control de calidad de la librería de ARNs pequeños (ARNp)

Una vez generada la librería de ARN pequeños se procedió a analizar el tamaño de los fragmentos formados. Utilizando cebadores complementarios a los adaptadores, se obtuvo un perfil de los fragmentos presentes en cada muestra. El objetivo era evaluar si los fragmentos formados contenían la secuencia de ARNp “inserto” (137-152 pb) o si por el contrario se trataba de secuencias inespecíficas formadas a partir de dímeros totales o parciales de adaptador (110-120 pb). El tamaño final esperado de los fragmentos fue ~140 pb para los que contenían como inserto miARNs y ~150 pb para otros ARN pequeños (piARN, Y-RNA, etc;) (Figura M6).

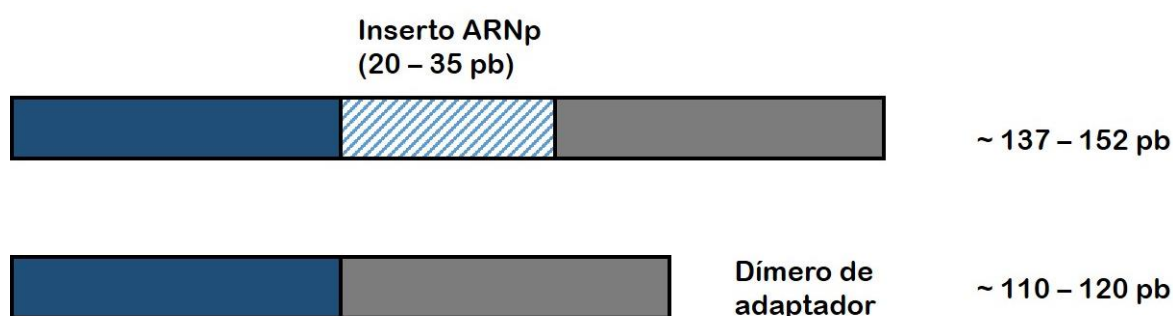


Figura M6. Esquema de los fragmentos esperados correspondientes a librería de ARNp (arriba) y dímeros de adaptador inespecíficos (abajo).

Primero, se llevó a cabo una PCR de amplificación utilizando una pareja de cebadores complementaria a los adaptadores y que contenían un fluoróforo FAM (*fluorescein amidite*) en uno de sus extremos. De este modo, los fragmentos amplificados tenían el mismo tamaño que los que se encontraban en la muestra original y añadían una molécula fluorescente que pudo ser detectada posteriormente. Para la PCR se utilizó 1 µL de librería inicial como molde y se llevó a cabo con la enzima *Multiplex Master Mix* (Qiagen). Las condiciones fueron: 95°C durante 15 minutos, 15 ciclos de amplificación (94°C x 30 segundos; 64°C x 1 minuto; 72°C x 1 minuto) y 72°C durante 10 minutos.

El sistema utilizado para visualizar el tamaño de las librerías fue el secuenciador capilar ABI 3730 (Applied Biosystems) utilizando un protocolo de análisis de fragmentos y analizando los electroferogramas correspondientes a cada muestra mediante el programa *GeneMapper 5.0* (Applied Biosystems) y el método de análisis para “microsatélites”. Para ello, se utilizaron 2 μ L del producto de la PCR anterior y 5 μ L formamida (Applied Biosystems) para mantener condiciones desnaturalizantes y estabilizar los fragmentos de hebra sencilla. Además, cada reacción también contenía 0,04 μ L de un marcador de tamaño molecular fluorescente de 10-500 pb (*Liz standard 500*, Applied Biosystems) y así poder estimar el tamaño final del fragmento generado.

8.3. Purificación en gel y reamplificación de la librería

La optimización implementada en el proceso de preparación de librerías de ARNp se centra en este paso. La casa comercial utilizada (TriLink biotechnologies) establece que es posible la generación de librerías sin presencia de dímeros de adaptador a partir de muy bajas cantidades de ARN total aislado a partir de tejido. No obstante, el ARN vesicular y circulante no presenta el mismo patrón de tamaños ni abundancia de tipos de ARN como el que se pueda obtener a partir de tejido o cultivos celulares. Debido a ello, un porcentaje importante de las librerías generadas todavía presentaba dímeros de adaptador inespecíficos que debían ser eliminados antes de cuantificar y secuenciar las librerías.

De este modo, una vez comprobados los tamaños de los fragmentos generados en la librería, se seleccionaron aquellos que se correspondían con insertos de ARN pequeños, fundamentalmente miARNs, eliminando por tanto los dímeros de adaptador. Esta purificación se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, utilizando condiciones desnaturalizantes (presencia de urea, que aumenta el pH) para asegurar la correcta selección final por tamaño de los fragmentos.

Por cada muestra, se utilizaron 6 μ L de librería inicial junto a 6 μ L de tampón de carga (*TBE-urea simple buffer 2X*, Invitrogen) y la mezcla se desnaturalizó a 70°C durante 3 minutos. Seguidamente, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida TBE-Urea al 15% (*Novex*, Invitrogen) y se introdujeron en una cubeta de electroforesis vertical *XCell sure lock mini cell* (Invitrogen) con el tampón de electroforesis TBE 1X (Fermentas). Como marcador de tamaño molecular se utilizó un cóctel de amplicones de tamaños conocidos (121 pb; 138 pb; 152 pb) preparados en el laboratorio mediante PCR convencional y que

nos permitieron comparar el tamaño de las bandas de dímero de adaptador, librerías de miARNs y librerías de otros ARN pequeños, respectivamente. Las condiciones de la electroforesis fueron un voltaje constante de 180 V y 13 mA durante 4h a temperatura ambiente.

Posteriormente se extrajeron los geles del cassette y se tiñeron durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con un agente intercalante *GelStar nucleic acid gel stain* (Lonza) a dilución 1X preparada en el momento. Finalmente, tras varios lavados con agua destilada, se visualizaron las bandas obtenidas en el transiluminador *TCP-15M* (Vilber Lourmat). Se cortó una sola banda de gel por cada muestra, situada entre el segundo y el tercer marcador molecular (138 y 152pb), para asegurar la selección de fragmentos de librería correspondientes a miARN (~ 140 pb) y otros ARNp (~ 150 pb). A continuación, la banda de poliacrilamida fue introducida en un tubo con 100 µL de tampón Tris-EDTA (*Sigma-Aldrich*), congelado a -80°C durante 30 minutos e incubado a 95°C durante 5 minutos para conseguir una mayor recuperación de los fragmentos de librería del gel. Finalmente, se realizó una centrifugación durante 5 minutos a 12,000 x g y recogimos el sobrenadante donde se encontraba nuestra librería purificada.

A partir del sobrenadante llevamos a cabo una reamplificación de 20 ciclos, con las mismas condiciones de PCR y enzima utilizadas descritas anteriormente (sección control de calidad), utilizando esta vez cebadores sin marcaje fluorescente pero con la misma secuencia nucleotídica. En este caso, además, las reacciones se llevaron a cabo en placas estériles de 96 pocillos (*VWR*) con un volumen inicial de librería purificada de 4 µL y un volumen final de reacción de 60 µL. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado para obtener un volumen final de 120 µL de librería purificada y reamplificada.

8.4. Concentración y control de calidad de la librería final

A partir de la librería purificada y reamplificada (120 µL), se concentró todo el volumen utilizando el kit comercial para purificar productos de PCR *Qiaquick PCR purification kit* (Qiagen). Este kit se basa en columnas de fibra de silicio que retienen sólo los productos de un tamaño > 100 pb. De este modo, se eliminan los restos de la reacción de amplificación como los cebadores y dNTPs, concentrando además en un volumen final menor de eluido de 25 µL (Tris-EDTA) en el que sólo estarán los fragmentos de librería seleccionados por tamaño del gel.

Finalmente, se volvió a repetir el control de calidad mediante el análisis del perfil de fragmentos con el secuenciador capilar *ABI 3730* (Applied Biosystems). Este último paso permitió corroborar que tanto la purificación en gel como la posterior amplificación de los tamaños de librería seleccionados funcionó correctamente y no quedaron restos de dímeros de adaptador. Las condiciones de la reacción son idénticas a las descritas anteriormente en el apartado 8.2.

8.5. Cuantificación de la librería final por PCR cuantitativo y generación de *pools*

La cuantificación de las librerías individuales finales se realizó mediante PCR cuantitativo utilizando el sistema *LightCycler 480 II* (Roche) y la enzima *Kapa sybr fast* (Kapa Biosystems) que utiliza el fluoróforo *sybr green* descrito anteriormente en el apartado 3.3. Se llevó a cabo una cuantificación absoluta mediante la preparación de una recta patrón. Para ello se utilizaron estándares comerciales del kit *Illumina library quantification DNA std. 1-6* (Kapa Biosystems), utilizando los cuatro más concentrados (20 pM, 2 pM, 0,2 pM, 0,02 pM) y se obtuvo mediante el software del aparato una recta de ajuste entre la concentración de los diferentes estándares y sus valores correspondientes de Ct. Sobre esta recta se interpolaron los valores de Ct de las librerías y se calculó su concentración final.

Una vez cuantificadas las librerías de manera individual, éstas se diluyeron a una concentración de 20 nM en un tampón Tris-HCl con Tween al 0,1 %. A partir de esta concentración se generaron los *pools* de muestras, 24 muestras por *pool*, correspondientes a los 24 índices diferentes de los que se disponía (Tabla M7).

8.6. Secuenciación por síntesis utilizando la plataforma HiSeq 2000

Los *pools* fueron enviados al Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG, Barcelona) donde se secuenciaron mediante la plataforma *HiSeq 2000* (Illumina) con una concentración final cargada en el secuenciador de 8 pM por *pool* que permitió generar los *clusters* a una densidad adecuada. La secuenciación fue llevada a cabo utilizando los reactivos del kit *TruSeq SBS v.3* (Illumina) en su versión de 50 ciclos de secuenciación de lectura única (*single read*).

La plataforma de secuenciación masiva *Illumina* utiliza la tecnología conocida como “secuenciación por síntesis” (SBS, en inglés). De este modo, antes de secuenciar las muestras, las moléculas de librería (ADNc) son amplificadas clonalmente “en puente” para formar los *clusters* sobre una superficie sólida denominada celda de flujo o *flow cell*. Este proceso consta de tres fases diferentes esquematizadas en la Figura M7-A): Inmovilización de las moléculas de ADN, amplificación isotérmica en puente y linealización, bloqueo e hibridación. Posteriormente, tiene lugar la secuenciación por síntesis en la que se utilizan nucleótidos marcados fluorescentemente con 4 fluoróforos distintos y con terminadores reversibles. En cada ciclo de síntesis sólo se incorporan los nucleótidos complementarios a la cadena molde (sólo un nucleótido en cada ciclo y por molécula). A continuación, se eliminan los nucleótidos sobrantes y el aparato capta la imagen de la fluorescencia generada tras la excitación mediante el láser interno. Este proceso se repite de forma cíclica y las imágenes son utilizadas por el software del aparato para generar la secuencia completa (Figura M7-B).

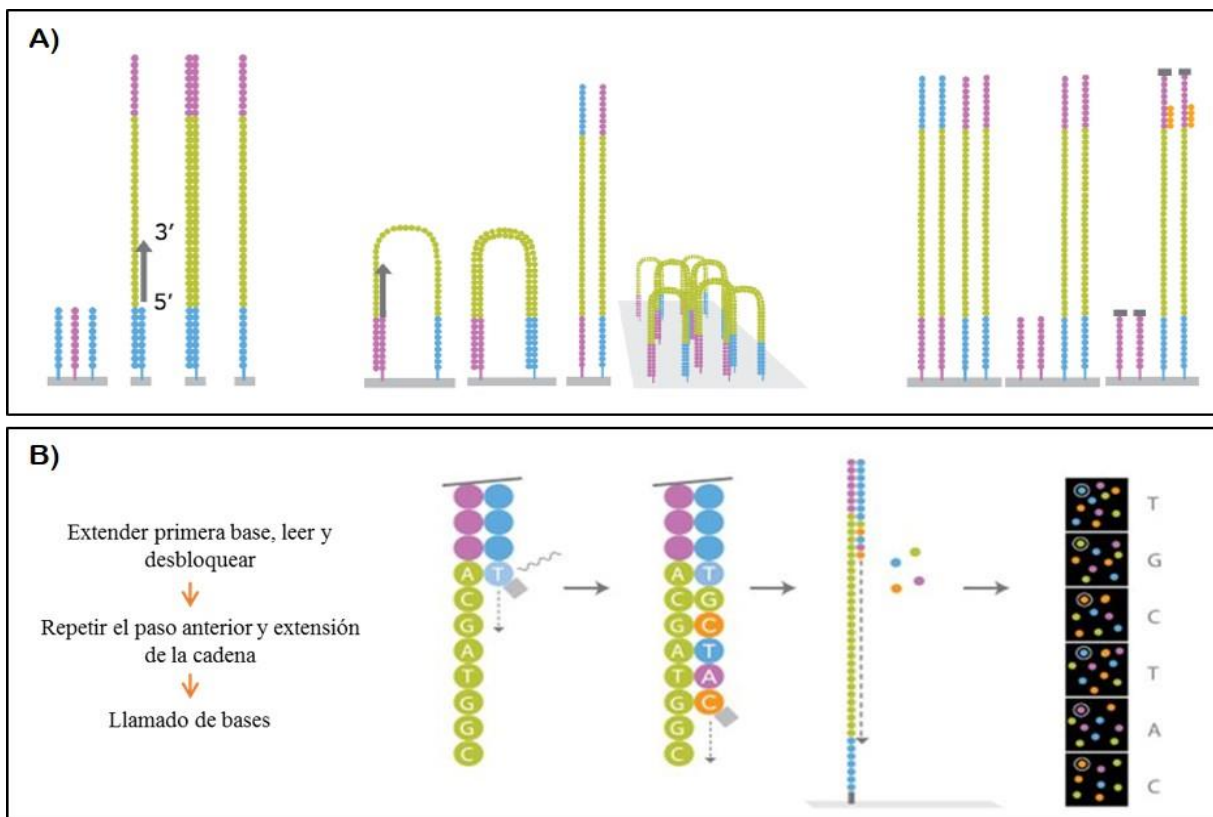


Figura M7. Secuenciación masiva por la plataforma *Illumina*. A) Esquema de la generación de *clusters* por amplificación “en puente”. B) Pasos seguidos en cada ciclo de la secuenciación por síntesis. (Adaptado de www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html)

8.7. Análisis bioinformático

En la secuenciación masiva, se obtienen millones de secuencias por cada individuo en formato FastQ. Se trata de datos brutos a los que se deben aplicar filtros y controles de calidad para poder asegurar que no existe sesgo que pueda afectar al análisis posterior. A continuación, se describen los principales pasos del análisis bioinformático llevados a cabo por la unidad de bioinformática de INCLIVA.

8.7.1. Control de calidad: *FastQC*

Antes de comenzar con el análisis de las secuencias para obtener diferencias biológicas se deben establecer controles de calidad sencillos. En este primer paso, se utiliza el programa *FastQC* (v.0.11.4) para examinar la calidad de las secuencias brutas obtenidas de forma sencilla y rápida, pudiendo detectar posibles errores en los datos generados por el aparato. Las principales funciones de este programa son: a) importar los archivos *FastQ* generados por el secuenciador, b) identificar problemas asociados a la secuenciación *per se* (secuenciador, librería de ADNc de partida, longitud de las secuencias, contenido de bases por secuencia), c) proporcionar tablas y gráficos para evaluar los datos de forma rápida y d) generar informes de calidad de las secuencias obtenidas (*Phred Score*).

8.7.2. Limpieza de secuencias: *Cutadapt*

En este paso utilizamos el programa *Cutadapt* (v.1.2.1) (Martin 2011), herramienta que permite encontrar y eliminar secuencias de adaptador, dímeros inespecíficos y regiones con baja calidad. Debido a que los miARNs son secuencias muy cortas, este paso es especialmente interesante en datos obtenidos de *small-RNA seq* ya que las lecturas obtenidas contienen el adaptador 3' en su interior y es imprescindible identificar las lecturas que contienen adaptador más inserto.

8.7.3. Mapeo de las lecturas contra el genoma de referencia: *Bowtie 2*

El siguiente paso en el análisis es crítico y consiste en alinear millones de lecturas cortas obtenidas en la secuenciación contra un genoma de referencia, en este caso GRCh38 modificado (*1000 Genomes Project*). En el caso de los miARNs la complejidad es mayor debido a que se trata de secuencias muy cortas y prácticamente idénticas en su

secuencia. En este caso se ha utilizado la herramienta *Bowtie 2* (v.0.12.7) (Langmead y Salzberg, 2012) debido a que trabaja con un algoritmo de precisión (*Burrows-Wheeler aligner*), generalmente usado para alinear secuencias cortas.

8.7.4. Recuento de lecturas: HTSeq

Para poder cuantificar el número de veces que aparece un miARN o cualquier otro ARNp en la muestra se ha utilizado el software HTSeq (Anders et al., 2014). Se trata de una herramienta basada en el lenguaje de programación *Python* que facilita la utilización de coordenadas genómicas (posiciones en el genoma de los distintos genes). Para ello la herramienta *htseq-count* procesa inicialmente los datos mediante el recuento de las lecturas que solapan con las coordenadas correspondientes a regiones genómicas de algún tipo de ARNp (e.g. anotaciones de miARNs). Las coordenadas genómicas utilizadas para el recuento de los ARNp fueron las siguientes: miRBase r.21 (Kozomara y Griffith-Jones, 2014) para los microARNs, piRNA bank v.2016-12-09 (Sai Lakshmi y Agrawal, 2008) para los piwiARN y NONCODE v.2016 (Zhao et al., 2016) para el resto de ARNp no codificantes para proteínas.

8.8. Análisis de la expresión diferencial de miARNs

Para establecer las diferencias en la cantidad de miARNs presentes en las vesículas extracelulares en los distintos grupos experimentales se utilizó el recuento de lecturas normalizadas. Se utilizó el paquete de R *EdgeR* (v.3.8.6) (Robinson et al., 2010) para los análisis de expresión diferencial y así determinar las posibles diferencias en los perfiles de miARNs obtenidos entre grupos. Las comparaciones estadísticas se ajustaron por las covariables edad, género y obesidad. Se construyó un gráfico de volcán (volcano plot) donde se incluyeron todos los miARNs expresados de forma diferencial, representando para cada uno su *fold change* ($\log_2(\text{fold change})$) y su tasa de falso descubrimiento (FDR) ($-\log_{10}(\text{FDR})$). De este modo, se seleccionaron los miARNs significativos según el siguiente criterio: \log en base 2 del *fold change* ≥ 2 (presentes en mayor cantidad en el grupo MALB al comparar con NO MALB) ó ≤ -2 (presentes en menor cantidad en el grupo MALB al comparar con NO MALB), con un p valor $< 0,05$ (Quackenbush 2002). De este modo, se obtiene un listado de miARNs candidatos que se utilizó en el análisis de enriquecimiento.

8.9. Análisis de enriquecimiento de miARNs e interacciones con rutas de la base de datos KEGG

Una vez obtenido el listado de miARNs expresados diferencialmente al comparar los grupos MALB y NO MALB, se realizó un análisis de enriquecimiento para identificar los procesos biológicos y rutas principales sobre los que estarían actuando. Primero, el listado fue sometido al análisis de sobrerrepresentación (ORA) y de enriquecimiento (GSEA), empleando las herramientas web especializadas miEAA (http://www.ccb.uni-saarland.de/mieaa_tool) y DIANA mirPath (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>) (Backes et al., 2016b). Estas dos estrategias de análisis son complementarias y se han utilizado ampliamente para facilitar la identificación de funciones jerárquicas de los miARNs en redes de regulación génica o de procesos biológicos.

La participación de cada miARN individual en numerosas redes interconectadas supone un desafío a la hora de entender su función específica en el proceso. Es fundamental establecer filtros para obtener modelos con mapas o redes de interacciones realistas que no contengan ruido de fondo ni sean excesivamente restrictivos (Bracken et al., 2016). Por ello se realizó una selección de rutas metabólicas a juicio de experto, para poder ajustar los resultados obtenidos a la presencia/ausencia de microalbuminuria en la hipertensión, en donde se eliminaron aquellos miARNs que interactuaban principalmente con otro tipo de enfermedades (neuronales, parasitarias, diversos tipos de cáncer, etc).

De este modo, se llevó a cabo una selección final de miARNs que fueron contrastados con la base de datos *KEGG Pathway* (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), utilizando el paquete de bioconductor MiRSEA (v.1.1) y se seleccionaron sólo las rutas en común obtenidas en ambos análisis. Esta base de datos surge a partir de la integración de numerosos experimentos con datos genómicos, transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos (Kaneshisa et al., 2012). El funcionamiento se basa en descomponer el conjunto de relaciones dentro de los procesos biológicos en elementos simples (Goto et al., 1997).

Finalmente, se representaron las interacciones de los miARNs seleccionados con las vías metabólicas y procesos biológicos en forma de red utilizando el paquete igraph (v. 1.0.1) de R.

9. VALIDACIÓN DE MICRO ARNs EXOSOMALES

9.1. Criterios de selección

Para seleccionar los miARNs del perfil asociado a microalbuminuria que se iban a validar se siguieron varios criterios. Primero, se comprobaron los valores de lecturas normalizadas para cada miARN en cada paciente, conocidos como “cuentas por millón de lecturas mapeadas” (CPM) y que se obtiene de dividir el nº de lecturas de un miARN entre el total de lecturas mapeadas para todos los miARNs en esa muestra, y multiplicando posteriormente este valor por un millón. Se trata de un filtro general que también se tiene en cuenta para los cálculos de expresión diferencial en el análisis bioinformático de los datos (Robinson et al., 2010). De este modo, se dio preferencia a aquellos miARNs que aparecían en $\geq 70\%$ de muestras de cada grupo de estudio y con un valor de CPM ≥ 1 .

Por otro lado, se siguieron criterios biológicos para seleccionar aquellos que aparecían en la literatura científica relacionados con daño renal o glomerular, albuminuria, hipertensión y célula o daño endotelial. Se prestó especial atención a aquellos miARNs del perfil que estuvieran regulando rutas biológicas sobre las que actuaban un mayor número de miARNs del perfil total (Ranking, Tabla R3). Además, se comoenzó por aquellos que modularan un número discreto de rutas, pudiendo así ofrecer información más detallada sobre su posible mecanismo de acción en la aparición y mantenimiento de daño renal asociado a la presencia de albuminuria.

9.2. Validación de miARNs por RT-qPCR

En este caso se utilizaron sondas *TaqMan* de nueva generación *TaqMan Advanced* (Applied Biosystems) cuyo único cambio respecto al procedimiento visto en el apartado 7 de la metodología estriba en una retrotranscripción universal mediante la adición de una cola *poly-A* al inicio del protocolo. De este modo, todos los micro ARN presentes en la muestra son retrotranscritos inicialmente a ADNc y solamente se utilizan cebadores específicos para cada miARN de interés al realizar la PCR cuantitativa. Para la validación de los miARN seleccionados se utilizó una cuantificación absoluta basada en la construcción de una curva estándar de concentraciones conocidas (Figura M8).

Para ello se elaboraron 3 curvas diferentes, cada una a partir de oligonucleótidos sintéticos con la misma secuencia que los miARNs utilizados (Sigma-Aldrich). Las secuencias se obtuvieron de la base de datos miRbase v.21 (University of Manchester) y la concentración utilizada para la retrotranscripción de cada miARN sintético fue 1×10^9 copias / μL . Una vez generado el ADNc, se llevaron a cabo diluciones seriadas 1:10 en tampón Tris HCl-Tween al 0,1% para elaborar los diferentes puntos de la curva estándar (1×10^9 copias / μL – 1×10^2 copias / μL) y poder cuantificar el número de copias total para cada muestra problema.

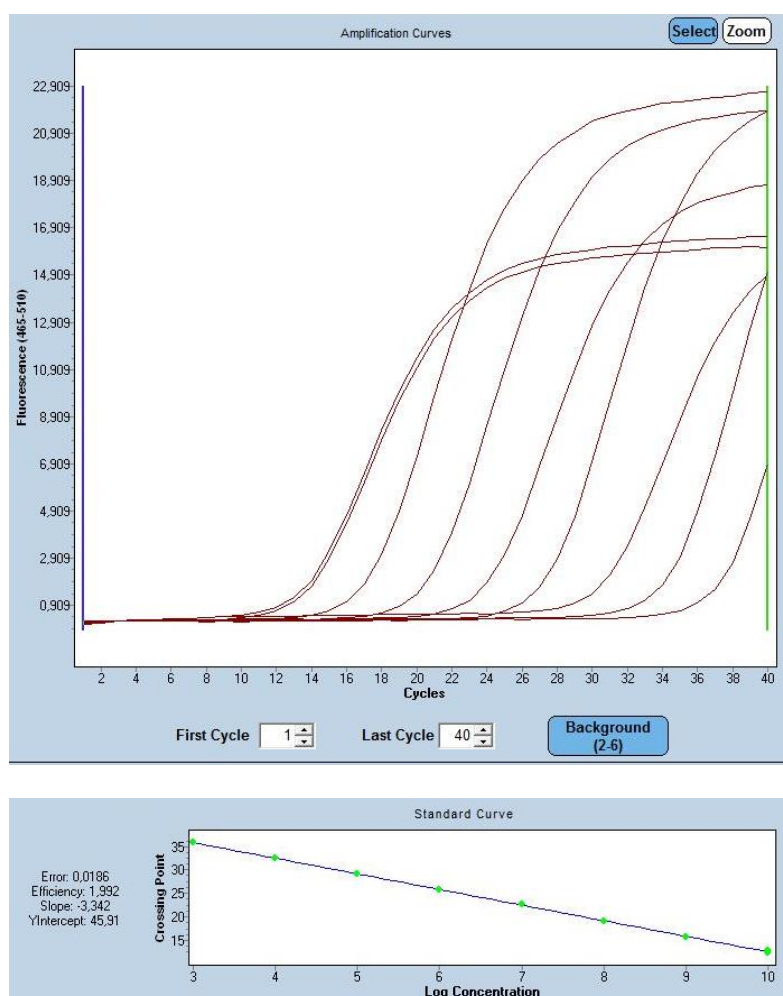


Figura M8. Curva estándar utilizada para calcular la cantidad de miR-26a-5p en número de copias.

En la imagen de arriba se observa las curvas de amplificación correspondientes a cada punto de la curva generado (10^9 - 10^2 copias). En la imagen de abajo se observa la recta de regresión calculada por el aparato y la relación de cada punto de la curva según su valor de Ct (*Crossing point*) y logaritmo de la concentración (en número de copias). En la parte izquierda se observan características de la reacción (eficiencia), así como de la recta calculada (error, pendiente, etc).

Siguiendo las instrucciones del fabricante, 2 μL de ARN total provenientes de exosomas de orina o plasma fueron utilizados con el kit *TaqMan advanced miRNA cDNA synthesis kit* (Applied Biosystems). Una vez obtenido el ADNc, este se diluyó 1:10 en agua libre de nucleasas. Posteriormente, se llevó a cabo una RT-qPCR individual para cada miARN seleccionado. Las sondas utilizadas fueron hsa-miR-26a-5p (477995_mir), hsa-miR-143-3p (477912_mir) y hsa-miR-222-3p (477982_mir). Se utilizó el master mix

recomendado para este tipo de ensayos *TaqMan Fast Advanced master mix* (Applied Biosystems). Las condiciones de la reacción fueron: 20 segundos a 95°C (desnaturalización enzima), seguido de 1 segundo a 95°C y 20 segundos a 60°C durante 40 ciclos. Para la validación se utilizó el sistema *Light Cycler 480 II* (Roche), los ensayos se realizaron en placas de 384 pocillos y para cada reacción se preparó un volumen final de 10 µL (5 µL de master mix, 2 µL de agua, 0,5 µL de sonda *TaqMan* específica y 2,5 µL de c DNA diluido 1:10). Cada experimento se llevó a cabo por triplicado y se incluyeron controles negativos tanto para la retrotranscripción (sin ARN inicial) como para la RT-qPCR (sin ADNc).

Finalmente, el programa del equipo (LC 480 II SW v.1.5) genera una recta de regresión entre el número de copias de los diferentes estándares y sus correspondientes valores de Ct. De este modo, los valores de Ct de cada muestra problema fueron interpolados en la recta de regresión, obteniéndose el número de copias final para cada muestra y miARN.

10. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE TGF-β Y VEGF EN ORINA

A raíz del perfil de miARNs obtenido tras realizar el análisis de enriquecimiento y los resultados de la validación por RT-qPCR, se decidió cuantificar los niveles de TGF-β y VEGF en orina mediante inmunoensayo ELISA basado en el método tipo sándwich de doble anticuerpo. Así pues, una vez centrifugada la orina, una alícuota de 100 µL de cada paciente se congeló a -80°C hasta su análisis. Se utilizó el kit comercial correspondiente en cada caso, *Human Quantikine ELISA TGF-β1 / VEGF Immunoassay* (R&D systems). Cada kit contiene una placa de 96 pocillos de poliestireno con un anticuerpo monoclonal (anti-TGF-β1 humana o anti-VEGF) ya inmovilizado. Se llevaron a cabo duplicados tanto de los estándares como de las muestras. Las concentraciones se obtuvieron utilizando la curva estándar y realizando el ajuste según las instrucciones del fabricante. La sensibilidad en el caso de TGF-β1 fue de 4,61 pg/mL con una variabilidad intraensayo del 2,4 - 3,4 % y una variabilidad interensayo del 5,7 – 8,4 %, mientras que en el caso de VEGF la sensibilidad fue de 9 pg/ml, con variabilidades de 3,5 – 6,5 % (intraensayo) y 5,0 – 8,5% (interensayo).

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los valores fueron expresados como la media \pm desviación típica o error estándar, para variables continuas, mientras que para las categóricas se expresaron como porcentaje. Primero se evaluó la normalidad de las variables mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov*. Cuando se trató de variables continuas con una distribución normal se llevaron a cabo comparaciones de medias mediante el test *t-Student*, mientras que se empleó el test U de *Mann-Whitney* en el caso de las variables no normales. Para el caso de variables categóricas se utilizaron tablas de contingencia y el test exacto de *Fisher*.

Las asociaciones entre los niveles de microARN, ARNm y proteínas con parámetros clínicos se compararon utilizando el coeficiente de correlación de *Spearman*. Asimismo, se construyeron curvas ROC (*Receiver operating characteristic curves*), calculándose de este modo el área bajo la curva (AUC, *Area Under the Curve*) para identificar la asociación de estos nuevos biomarcadores con las variables clínicas.

Se consideró estadísticamente significativo un p-valor \leq de 0,05. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los programas SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, v. 12.1.3) o *GraphPad Prism* Software (v. 6.0).

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO

La población principal de estudio incluyó un total de 52 pacientes hipertensos (65% varones, edad media de $53,7 \pm 7$ años) que se dividieron en dos grupos basados en la presencia o ausencia de Excreción Urinaria de Albúmina (EUA). De este modo, 24 pacientes configuraron el grupo con elevada EUA (grupo MALB: $162,8 \pm 168,2$ mg/g) mientras 28 presentaban niveles normales (grupo NO MALB: $3,4 \pm 2,3$ mg/g). El tratamiento que recibían los pacientes en ambos grupos era muy similar, basado en antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA II), diuréticos, antagonistas del calcio, así como alfa y betabloqueantes. Tan sólo varió el porcentaje en la administración de antagonistas del calcio y betabloqueantes, mayor en ambos casos para el grupo NO MALB, pero sin ser significativo (64% vs 38% y 32% vs 13%, respectivamente) (Tabla R1).

Además del cambio en los valores de EUA, los pacientes del grupo MALB también presentaron valores clínicos significativamente aumentados para el colesterol total ($201,8 \pm 34,1$ mg/L vs $173,6 \pm 28,4$ mg/L) y LDL ($130,8 \pm 30,1$ vs $107,6 \pm 24,8$ mg/L).

Por lo que respecta a la población complementaria, se incluyeron un total de 12 pacientes diagnosticados de nefropatía diabética (ND) (82% varones, edad media de $64,4 \pm 9$ años) cuya principal característica clínica fue la presencia de macroalbuminuria, con niveles significativamente aumentados de EUA comparado con el grupo MALB ($531,6 \pm 209,7$ mg/g vs $162,8 \pm 168,2$ mg/g, una vez normalizados por creatinina). Además del aumento en los valores de EUA, los pacientes del grupo ND también presentaron una mayor edad y valores clínicos significativamente aumentados de triglicéridos, obesidad central y diabetes.

Esta población también presentaba elevada presión arterial, por lo que su tratamiento en todos los casos incluyó varios antihipertensivos (ARA II en combinación con otros), estatinas, así como medicación contra la diabetes basada en antidiabéticos orales e insulina (80%), y también tomaban todos ácido acetilsalicílico.

Tabla R1. Características clínicas de las poblaciones de estudio.

Variables clínicas	MALB (n = 24)	NO MALB (n = 28)	ND (n = 12)
Edad (años)	52,63 ± 8,44	54,57 ± 5,55	64,36 ± 9,19††
Género (varones)	66,7 %	64,3 %	81,82 %
Presión arterial sistólica (mmHg)	136,13 ± 10,60	136,46 ± 24,4	141,09 ± 28,48
Presión arterial diastólica (mmHg)	83,88 ± 15,01	88,32 ± 15,01	80,82 ± 10,81
Presión de pulso (mmHg)	52,25 ± 12,26	48,14 ± 16,39	60,27 ± 21,56
Glucosa (mg/dL)	119,46 ± 45,14	118,29 ± 39,76	153,00 ± 63,92
Hemoglobina glicosilada (%)	6,61 ± 0,33	5,99 ± 0,83	7,36 ± 1,15
Colesterol total (mg/dL)	201,75 ± 34,06***†	173,64 ± 28,37	172,10 ± 23,71
LDL (mg/dL)	130,79 ± 30,13***†	107,57 ± 24,81	100,82 ± 16,01
HDL (mg/dL)	50,92 ± 13,94	49,36 ± 10,61	40,27 ± 10,01
TG (mg/dL)	148,13 ± 76,00	129,36 ± 59,06	287,27 ± 246,18††
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,86 ± 0,06	0,89 ± 0,21	1,21 ± 0,44
FGR (mL/min/1,73 m ²)	97,11 ± 26,55	87,90 ± 19,28	69,87 ± 26,65
Perímetro de cintura (cm)	107,23 ± 14,61	98,88 ± 12,39	110,05 ± 9,43
Obesidad central (%)	54,2	50	72,73†
IMC (kg/m ²)	31,68 ± 6,65	30,09 ± 5,95	35,35 ± 7,50
Obesidad (%)	50	39,3	72,73†
Tipo de obesidad (%)			
Tipo I	29,2	17,9	9,09
Tipo II	8,3	10,7	45,45†
Tipo III	12,5	10,7	18,18
Diabetes (%)	37,5	32,1	100††
Dislipemia (%)	87,5	82,1	100
Fumador (%)	45,8	46,4	18,18
Ex-fumador (%)	29,2	14,3	18,18
Creatinina en orina (mg/dL)	130,46 ± 106,73	120,82 ± 61,84	77,64 ± 25,58††
EUA (mg/L)	166,48 ± 119,66***	4,06 ± 3,99	370,98 ± 58,64††
Ratio EUA / Creatinina (mg/g)	162,78 ± 168,21***	3,36 ± 2,28	531,61 ± 209,73††
Ratio Proteína / Creatinina (g/g)	1,36 ± 0,54	-	2,64 ± 2,38
Tratamiento (%)			
ARA II	100	100	
Diuréticos	63	64	
Antagonistas del Calcio	38	64	
Alfabloqueantes	29	29	
Betabloqueantes	13	32	-

Los datos se expresan como media ± desviación típica, o porcentaje de pacientes (%). Comparaciones entre grupos MALB y NO MALB: ** p < 0,01, *** p < 0,001. Comparaciones frente a grupo nefropatía diabética: † p < 0,05; †† p < 0,01. ARA II: Antagonistas del Receptor de Angiotensina II; EUA: Excreción urinaria de albúmina; FGR: Filtrado glomerular renal; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; IMC: Índice de masa corporal; LDL: Lipoproteínas de baja densidad; MALB: microalbuminuria; ND: nefropatía diabética; TG: Triglicéridos.

2. NIVELES DE ARNm Y PROTEÍNAS ASOCIADAS A PODOCITOS EN EL SEDIMENTO URINARIO DE PACIENTES HIPERTENSOS. ASOCIACIÓN CON LA EXCRECIÓN URINARIA DE ALBÚMINA

2.1. Niveles de ARNm y proteínas asociadas a podocitos en el sedimento urinario de pacientes hipertensos

A partir del *pellet* de la orina se extrajeron el ARN total y proteínas y se midieron los niveles de moléculas relacionadas con la función podocitaria en los tres grupos de estudio: NO MALB, MALB y ND. Por lo que respecta a los niveles de ARNm, estos se midieron por RT-qPCR, se normalizaron por dos genes de expresión constitutiva, β -actina y β -2-microglobulina, y se expresaron de forma relativa al grupo hipertenso control sin elevada EUA (grupo NO MALB). En el caso de las proteínas asociadas a podocitos, los valores también se normalizaron por β -actina.

Los niveles de ARNm de cada uno de los genes diana utilizados y para cada grupo de enfermedad se observan en la Figura R1. Se produjo un descenso significativo del ARNm urinario de nefrina (72%, $p = 0,007$), CD2AP (63%, $p = 0,01$) y podocina (54%, $p = 0,03$) en el grupo MALB; mientras que en el grupo ND el descenso fue ligeramente mayor pero sin alcanzar diferencias significativas frente al grupo MALB. Por su parte, los niveles de podocalixina así como de las acuaporinas 1 y 2 (típicas de células tubulares de la nefrona) no presentaron cambios (Figura R1). Además, también se produjeron cambios en los valores de ARNm para WT1 y sinaptopodina, pero no se alcanzó significatividad al poder ser cuantificados en un 50% de las muestras.

Por lo que respecta a los niveles proteicos, se produjo un aumento significativo en los valores de nefrina (2,6 veces), CD2AP (2,3 veces) y podocalixina (2,5 veces) en el grupo MALB ($p < 0,0001$). En el grupo ND los valores se mostraron muy similares a los obtenidos en el grupo MALB, a excepción de nefrina, cuyos niveles aumentaron 5,4 veces respecto al grupo de referencia NO MALB y 2,1 veces respecto al grupo MALB (ambos con $p < 0,0001$). Tampoco en estos experimentos hubo cambios respecto a la cantidad de acuaporina 1 detectada (Figura R2). Por lo que respecta a WT1, podocina y sinaptopodina, sólo pudieron ser cuantificados en el 30% de los pacientes.

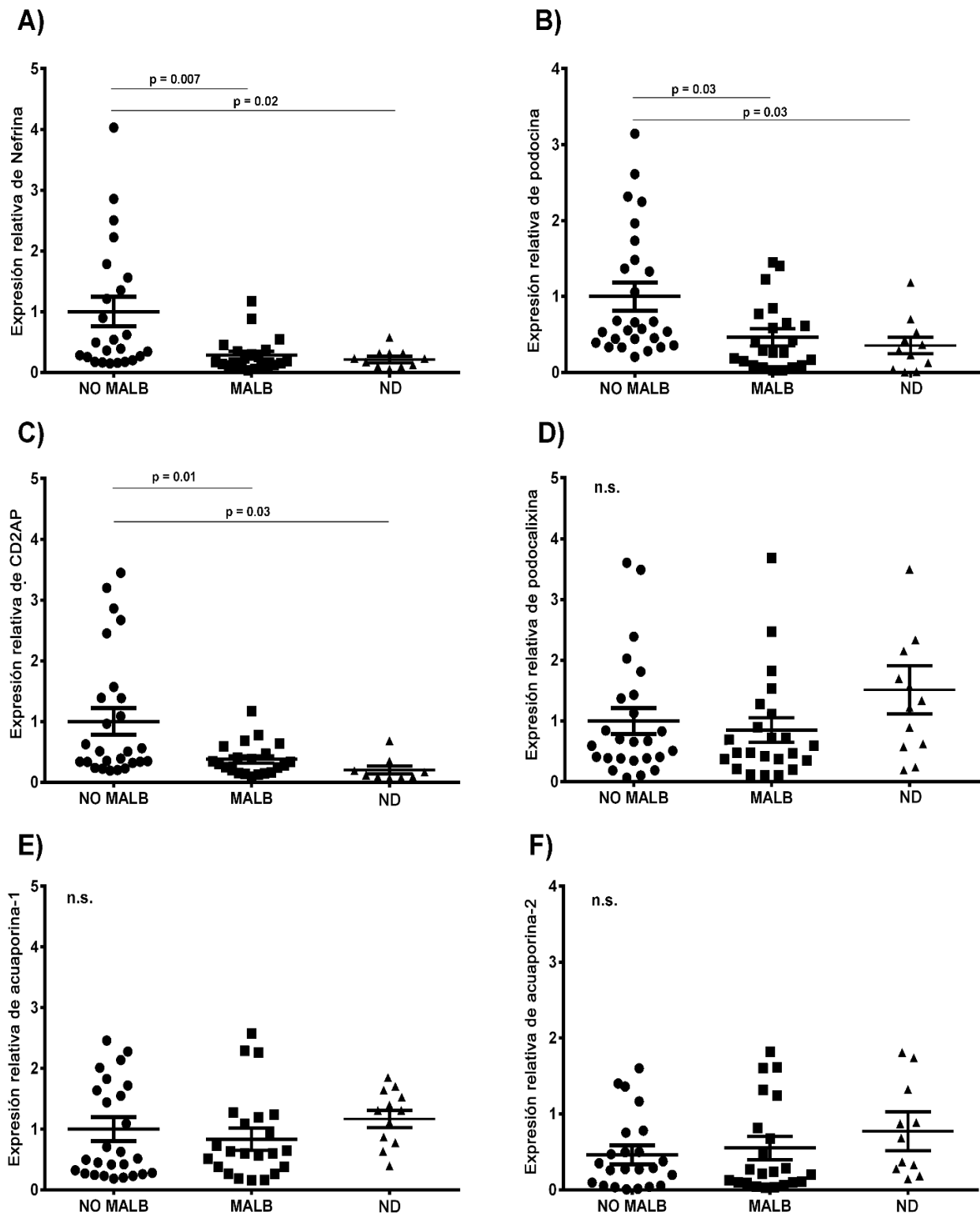


Figura R1. Disminución de los niveles de ARNm de genes asociados a la función podocitaria medidos por RT-qPCR. A-D) Resultados para nefrina, podocina, CD2AP y podocalixina, respectivamente. **E-F)** Resultados de acuaporina 1 y 2, marcadores de túbulo renal proximal y distal, respectivamente. Las barras horizontales muestran la media y las verticales el error estándar de la media. MALB: microalbuminuria; ND: nefropatía diabética; n.s.: no significativo; p: p valor.

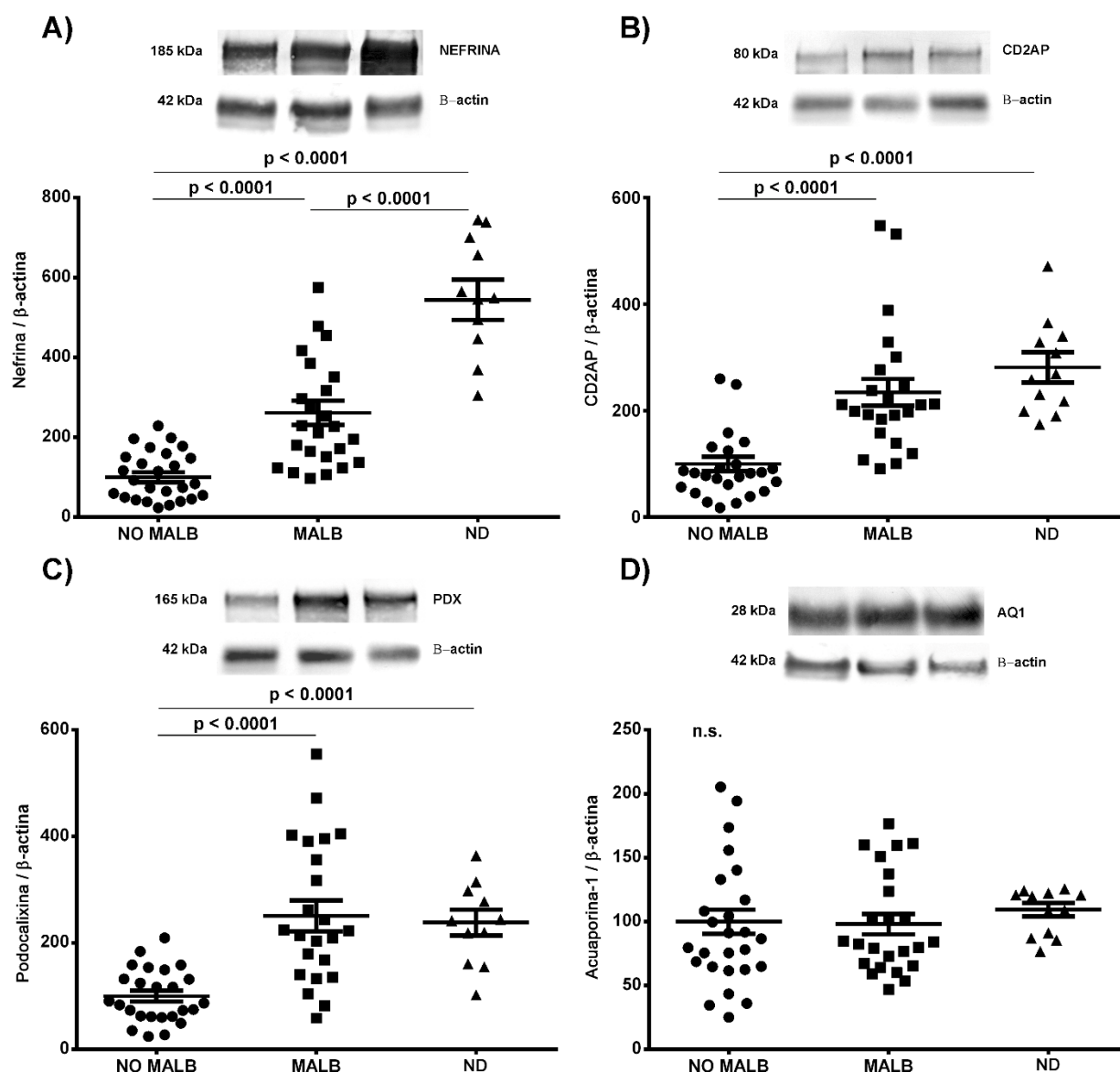


Figura R2. Aumento de los niveles proteicos de genes asociados a la función podocitaria. Los valores fueron medidos mediante western-blot y normalizados por la cantidad de β -actina. **A-C)** Valores de nefrina, CD2AP y podocalixina, respectivamente. **D)** Valores de acuaporina 1, marcador de túbulo renal proximal. Las barras horizontales muestran la media y las verticales el error estándar de la media. AQ1: acuaporina 1; MALB: microalbuminuria; ND: nefropatía diabética; n.s: no significativo; p: p valor; PDX: podocalixina.

Tanto a nivel proteico como transcripcional, estos resultados muestran que existe un cambio fenotípico en los podocitos de los pacientes a medida que aumenta la EUA, que se refleja en el descenso de los niveles de ARNm y el aumento de proteínas asociadas a la función podocitaria liberadas en la orina.

2.2. Relación de los niveles de ARNm y proteínas asociadas a podocitos en el sedimento urinario con la excreción urinaria de albúmina (EUA)

Se estudió la asociación entre los niveles de ARNm y proteínas asociados a podocitos con la afectación de la función renal, definida como el aumento de EUA normalizada por los niveles de creatinina en orina, y utilizando los tres grupos de estudio en su conjunto (n=64).

Para los niveles de ARNm, se obtuvieron correlaciones inversas con la presencia de albúmina en orina con una $r = -0,43$ para nefrina ($p < 0,01$), $r = -0,39$ para podocina ($p < 0,05$) y $r = -0,38$ para CD2AP ($p < 0,05$) (Figura R3). Por su parte, ni los valores urinarios de podocalixina ni los de acuaporina 1 y 2 mostraron asociación significativa con la función renal.

Por su parte, al correlacionar los niveles proteicos obtenidos se encontraron asociaciones positivas con la presencia de albumina en orina. De este modo, podocalixina y CD2AP presentaron una $r = 0,69$ y $r = 0,61$, respectivamente ($p < 0,0001$). Especialmente significativo fue el caso de nefrina, obteniéndose una $r = 0,79$ ($p < 0,0001$) (Figura R4).

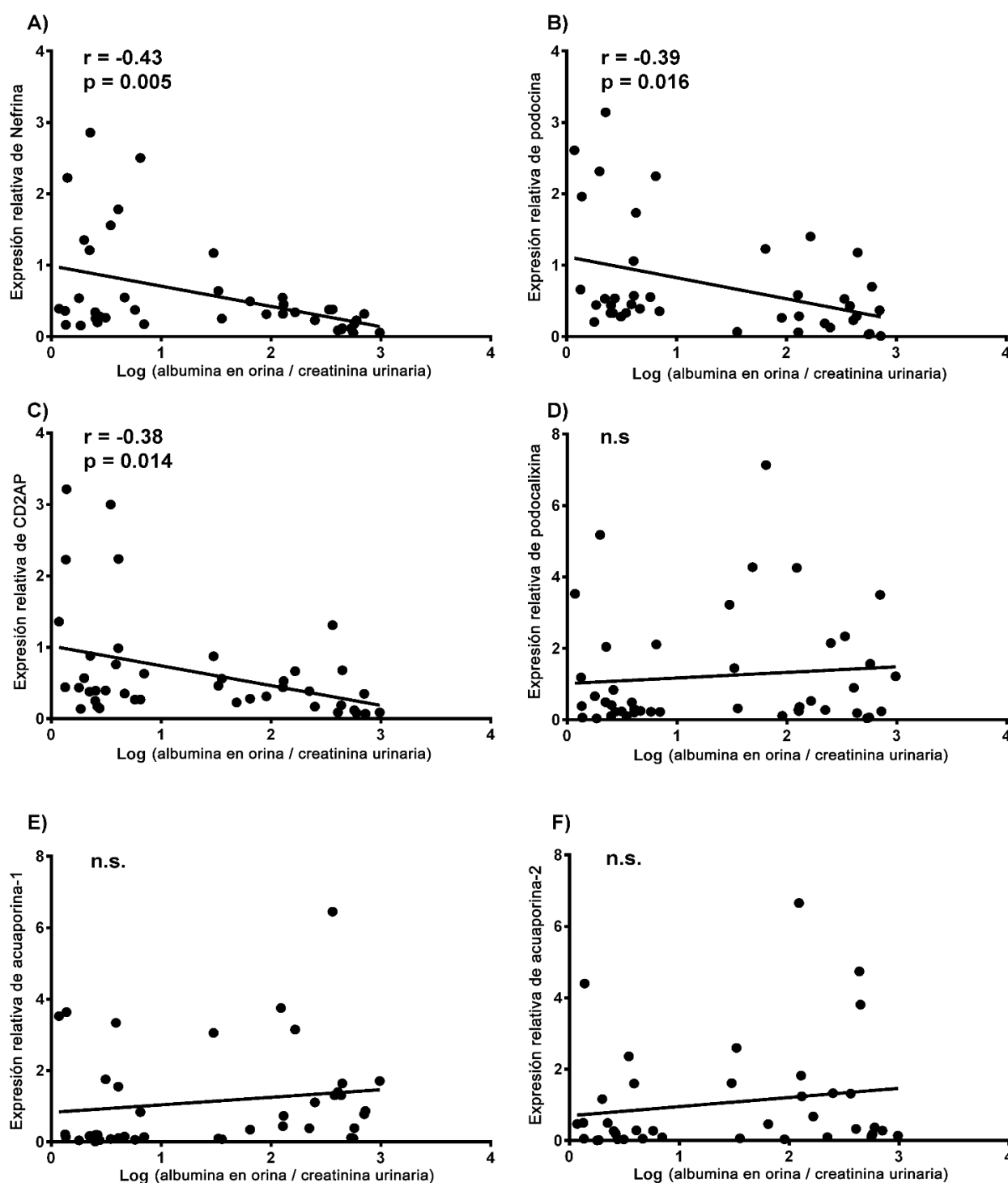


Figura R3. Correlación de los niveles urinarios de ARNm de genes asociados a la función podocitaria con el logaritmo de excreción urinaria de albumina (EUA) normalizada. A-D) Correlaciones con los valores proteicos de nefrina, podocina, CD2AP y podocalixina, respectivamente. **D-E)** Acuaporinas 1 y 2, marcadores de túbulo renal. MALB: microalbuminuria; ND: nefropatía diabética; n.s: no significativo; p: p valor.

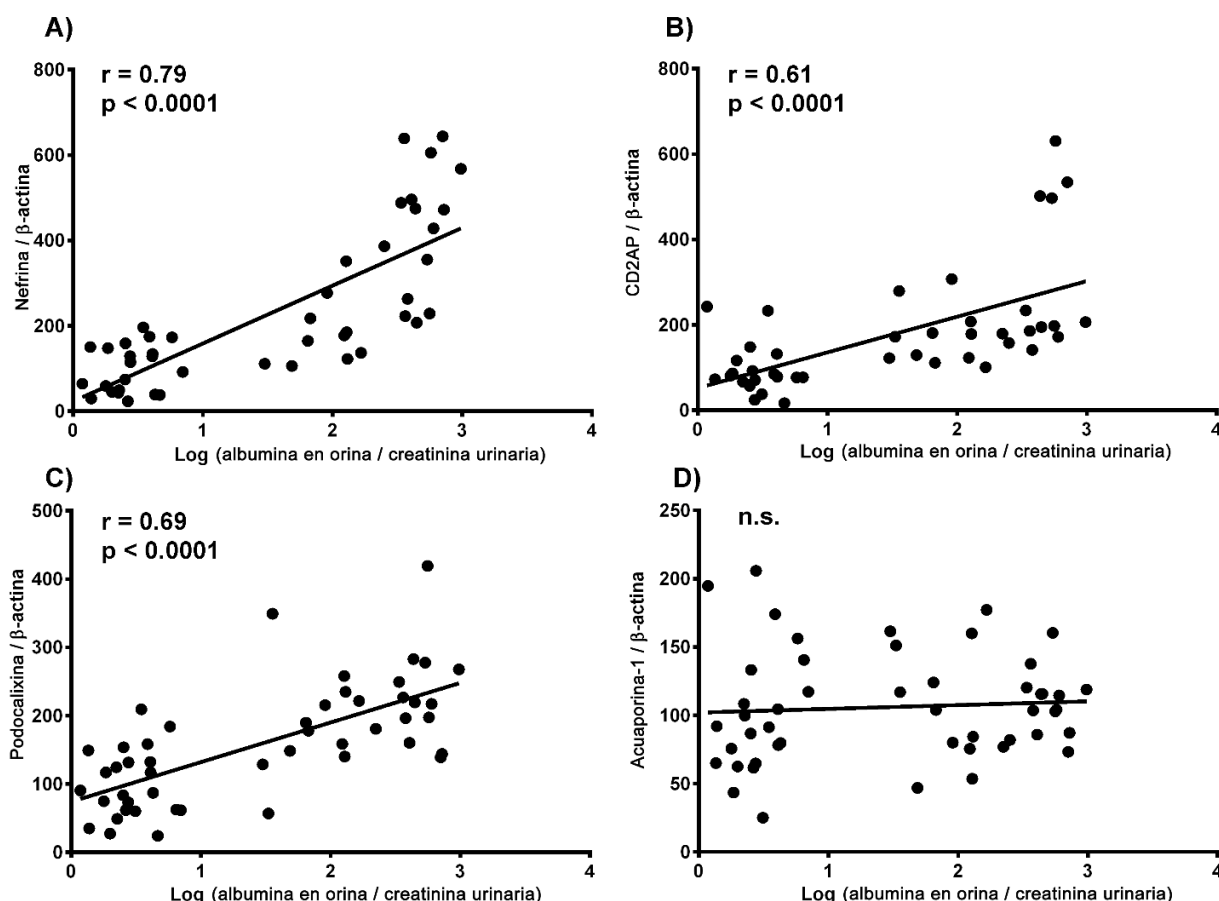


Figura R4. Correlación de los niveles proteicos de genes asociados a la función podocitaria con el logaritmo de excreción urinaria de albumina (EUA) normalizada. A-C) Correlaciones con los valores proteicos de nefrina, CD2AP y podocalixina, respectivamente. **D)** Acuaporina 1, marcador de túbulo renal proximal. MALB: microalbuminuria; ND: nefropatía diabética; n.s: no significativo; p: p valor.

2.3. Curvas ROC de los niveles de ARNm y proteínas asociados a podocitos en el sedimento urinario de pacientes hipertensos

Para evaluar la capacidad de los niveles de ARNm y proteínas de discernir entre pacientes hipertensos con valores normales y aumentados de EUA se elaboraron curvas ROC (Receiver Operating Characteristic). En la Tabla R2 se puede encontrar un resumen de las áreas bajo la curva obtenidas (ABC) junto a los intervalos de confianza y la significación estadística. Los niveles proteicos de nefrina, CD2AP y podocalixina se manifestaron como los más discriminativos al obtenerse en todos los casos $ABC \geq 0,90$ y p valor $< 0,0001$. En el apartado de ARNm se obtuvieron valores más discretos, destacando nefrina ($ABC = 0,71$; $p = 0,009$) y podocina ($ABC = 0,70$; $p = 0,014$). Tanto a nivel proteico como de ARNm, el área bajo la curva para acuaporina no presentó áreas significativas.

Tabla R2. Resumen de las curvas ROC de los niveles de ARNm y proteínas asociadas a podocitos para detectar la presencia de EUA aumentada en los pacientes hipertensos.

Nombre	Tipo de molécula	ABC (95% IC)	p valor
Nefrina	ARNm	0,71 (0,57-0,86)	0,009
	Proteína	0,94 (0,88-0,99)	0,0001
CD2AP	ARNm	0,67 (0,52-0,82)	0,036
	Proteína	0,91 (0,82-0,99)	0,0001
Podocina	ARNm	0,70 (0,56-0,85)	0,014
	Proteína	-	-
Podocalixina	ARNm	0,57 (0,42-0,73)	0,3625
	Proteína	0,90 (0,83-0,98)	0,0001
Acuaporina 1	ARNm	0,65 (0,48-0,82)	0,080
	Proteína	0,54 (0,38-0,70)	0,601

Pacientes hipertensos con niveles normales de EUA (grupo NO MALB, n=28) y con EUA aumentada (grupos MALB (n=28) y ND (n=12)). ABC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza.

Estos resultados muestran que existe una relación inversa del aumento en la EUA con los niveles de ARNm y una asociación directa con los niveles proteicos, siendo en ambos casos moléculas participantes de la hendidura de filtración (nefrina, CD2AP y podocina) las que muestran una mayor sensibilidad al aumento de EUA. Del mismo modo, los valores obtenidos de las curvas ROC otorgan un papel discriminativo al aumento proteico de nefrina y CD2AP, y al descenso de ARNm de nefrina y podocina.

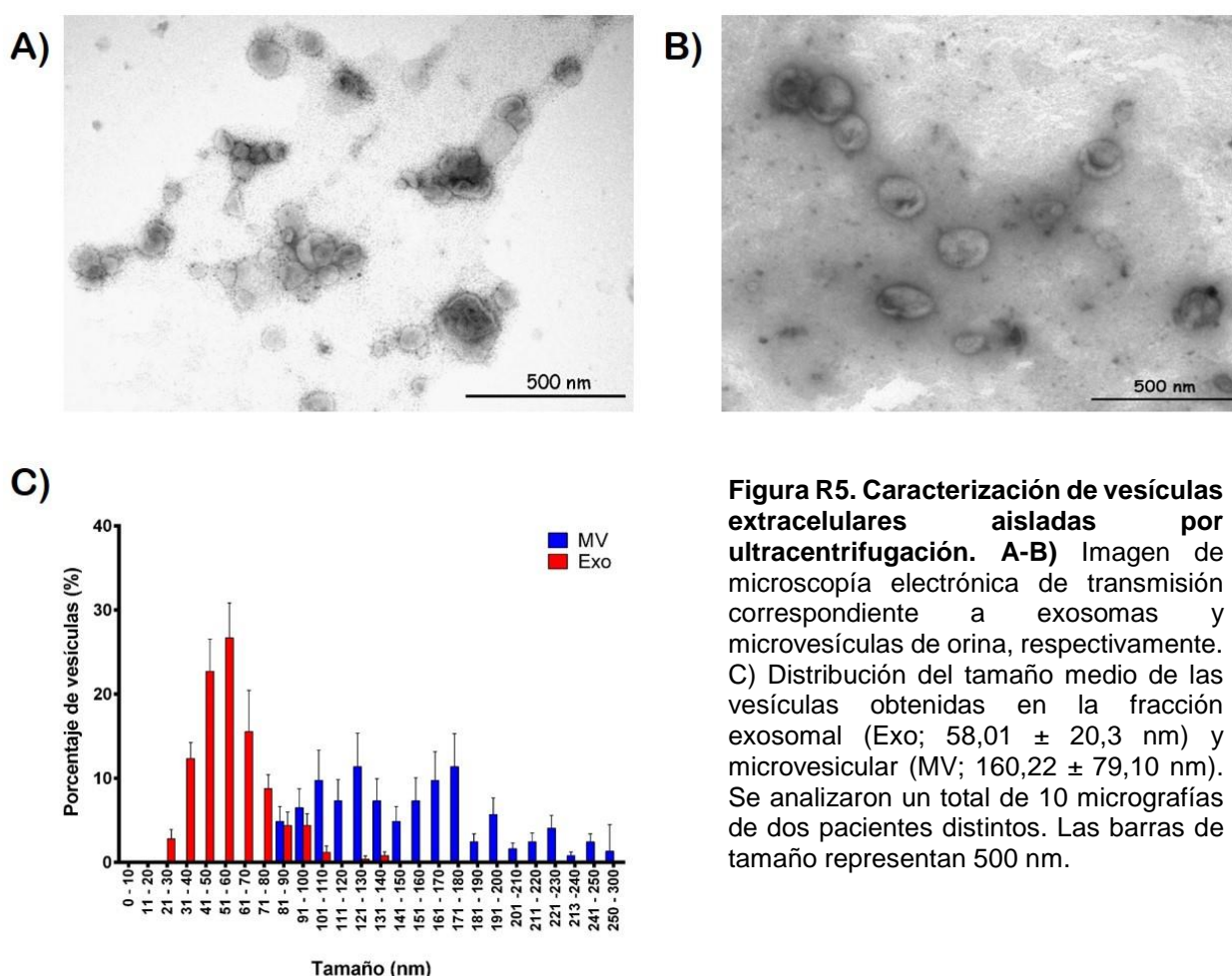
3. CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE ORINA Y PLASMA EN PACIENTES HIPERTENSOS

Se utilizaron diferentes estrategias para evaluar el correcto aislamiento de fracciones ricas en exosomas o microvesículas. Para ello, se llevaron a cabo varias técnicas complementarias que permitieron caracterizar las muestras por tamaño, composición proteica y concentración.

3.1. Microscopía electrónica de transmisión

Se utilizó una tinción negativa con acetato de uranilo al 1% (descrita en la sección de material y métodos) y se obtuvieron imágenes de preparaciones de microvesículas y exosomas mediante microscopía electrónica de transmisión. En la Figura R5 se muestran dos micrografías de VE de orina, exosomas (A) y microvesículas (B), donde se observa la forma redondeada y la presencia de la bicapa lipídica con contenido electrodens.

También se analizaron 10 micrografías de dos pacientes diferentes para calcular el tamaño de las VE. En el caso de los exosomas se midieron 251 eventos, obteniéndose un tamaño medio de $58,02 \pm 20,31$ nm. Por su parte, las microvesículas presentaron un tamaño medio de $160,22 \pm 79,10$ nm para un total de 120 eventos (Figura R5).



3.2. Análisis proteico mediante western blot

La caracterización proteica se utilizó para confirmar el correcto aislamiento de vesículas extracelulares mediante ultracentrifugación y poder confirmar la presencia de fracciones enriquecidas en exosomas o microvesículas sin estructuras subcelulares. Para ello, se utilizaron marcadores típicos exosomales como la tetraspanina CD9 y TSG-101, que forma parte del complejo de transporte endosomal ESCRT-1. La Figura R6 muestra fuerte marcaje de estas proteínas en la fracción exosomal al compararlo con el obtenido en las microvesículas (MVs) y el sobrenadante libre de exosomas (Sn). Además, se comprobó como otros marcadores no exosomales como nucleoporina 62 (núcleo), calnexina (retículo) y GM-130 (Golgi) no aparecían en las fracciones vesiculares mientras sí lo hacían intensamente en el *pellet* celular HuH7, utilizado como control positivo.

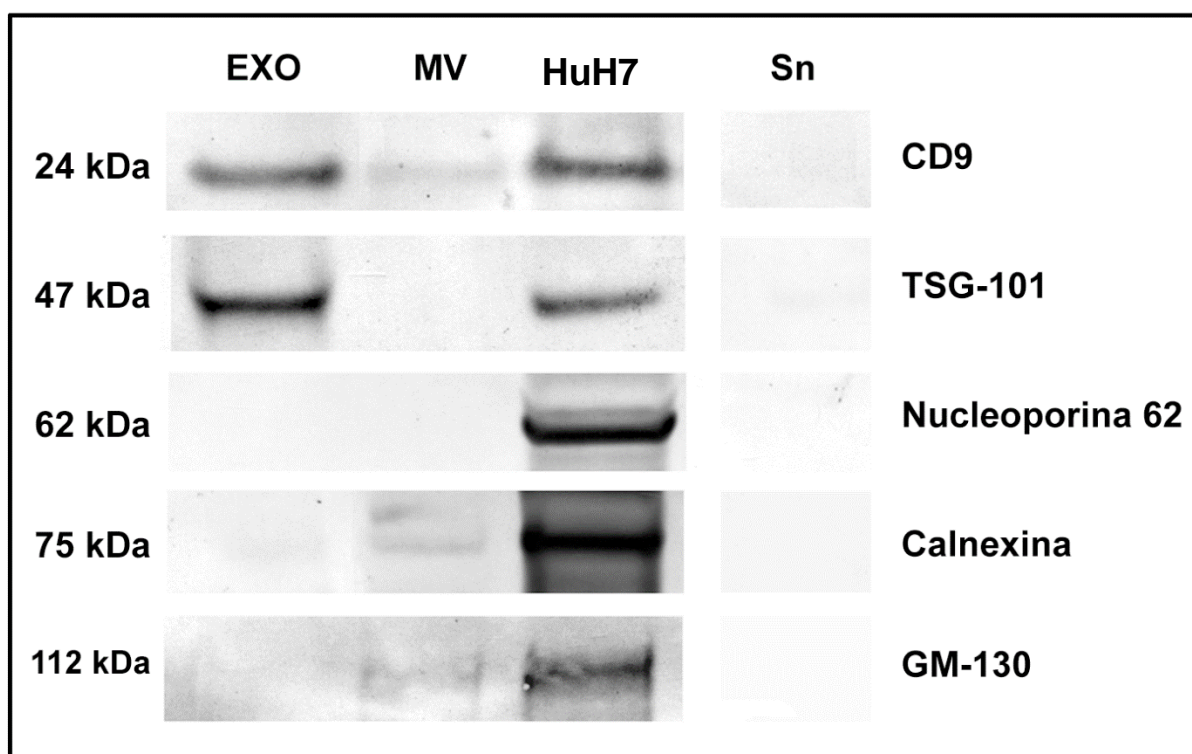


Figura R6. Caracterización de vesículas extracelulares de la orina mediante *western blot*. En la figura se muestra como la fracción exosomal (EXO) está enriquecida para los marcadores CD9 y TSG-101 comparado con las microvesículas (MV). También se comprobó la ausencia de marcadores no exosomales específicos de núcleo (nucleoporina 62), retículo endoplásmico (calnexina) y aparato de Golgi (GM-130). Se utilizó *pellet* celular (línea HuH7) como control positivo y sobrenadante de orina libre de exosomas (Sn) como control negativo.

3.3. Perfil de tamaños y cuantificación mediante TRPS

Esta tecnología permite el análisis directo del tamaño de cada vesícula al pasar por un nanoporo bajo unas condiciones de corriente base y voltaje conocidas. Así, se obtuvo

un perfil de tamaños y concentración para cada tipo de VE en orina y plasma. En todos los casos se analizaron al menos 300 vesículas / muestra.

3.3.1. Perfil de tamaños de las vesículas extracelulares de orina y plasma

Cada fracción vesicular, exosomal o microvesicular, fue analizada por separado con su poro correspondiente. Una vez obtenidos los perfiles de tamaño, estos se representaron conjuntamente para poder observar la distribución diferenciada de exosomas y microvesículas. En la Figura R6 se muestran los perfiles de 3 muestras de orina y 5 muestras de plasma. Las modas de tamaños fueron muy similares dentro de cada tipo de vesícula y fluido (colores cálidos: EXO; fríos: MV). En orina se obtuvieron promedios de dichas modas de 110 nm para exosomas y 230 nm para microvesículas. Mientras que en plasma los tamaños de las VE fueron ligeramente superiores, obteniéndose promedios de modas de 145 nm y 290 nm, respectivamente (Figura R6B).

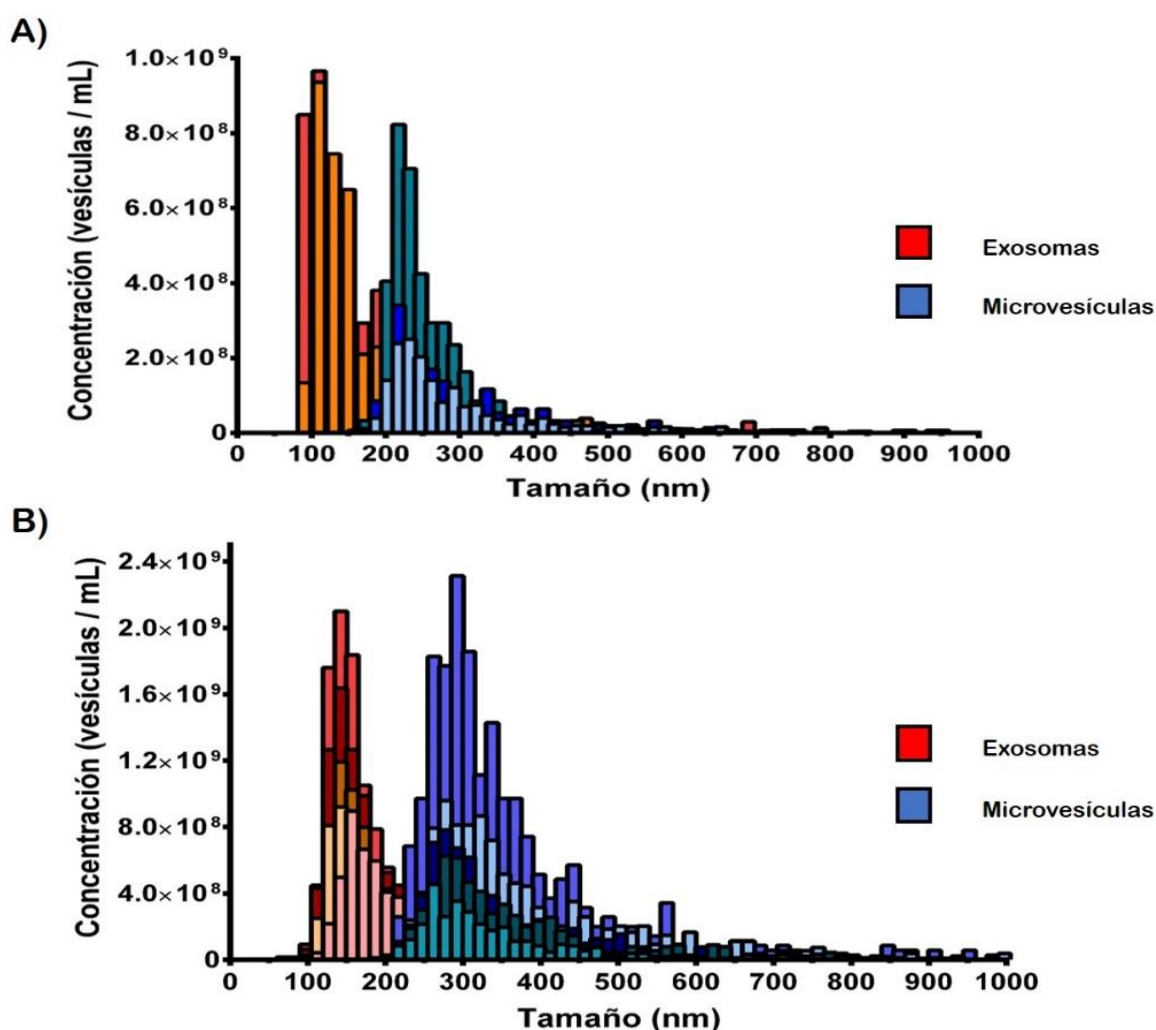


Figura R6B. Comparación de tamaños obtenidos mediante TRPS de VE de orina (A) y plasma (B) en 3 y 5 muestras, respectivamente.

3.3.2. Cuantificación de vesículas extracelulares de orina y plasma

Del mismo modo que se ha descrito anteriormente, se llevó a cabo una representación de la concentración de VE de orina y plasma. En este caso, exosomas y microvesículas de pacientes y controles sanos se representaron por separado para poder evaluar mejor el cambio en las poblaciones de cada tipo de VE y fluido. En la Figura R7 se representan 5 muestras de pacientes y controles de VE de orina. Se observó como las muestras de pacientes (colores vivos) presentaban una mayor concentración, obteniéndose entre 3 – 5 veces más microvesículas y unas 5 -10 veces más exosomas que en los controles, aunque no se alcanzó significatividad estadística. Por lo que respecta a las VE de plasma, se midieron 4 pacientes y controles y se obtuvieron valores muy similares en ambos (Figura R7). Además, la concentración para exosomas y microvesículas fue más homogénea que en las VE urinarias, obteniéndose todas las concentraciones individuales en el rango de 5×10^8 – $2,5 \times 10^9$.

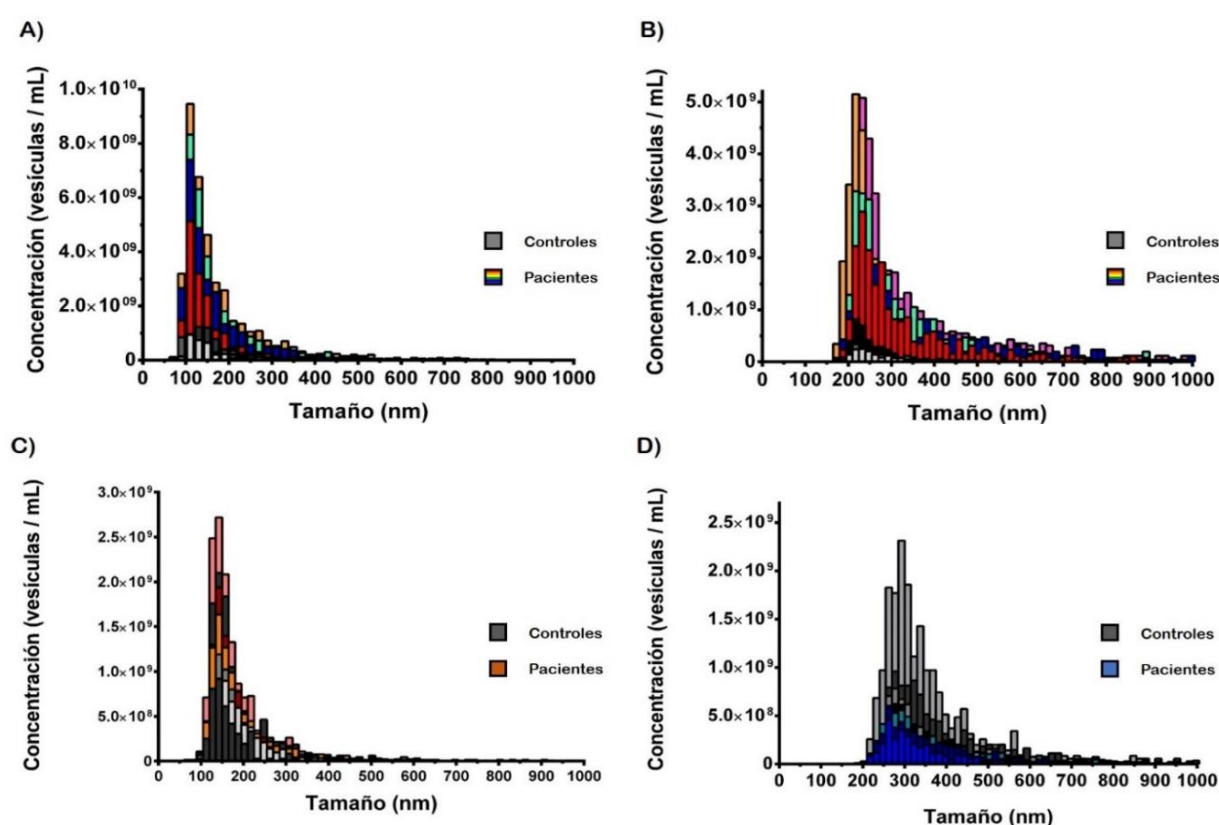


Figura R7. Perfil de tamaños y concentración obtenidos mediante TRPS de VE de orina (A, exosomas; B, microvesículas) y plasma (C, exosomas; D, microvesículas) en 5 y 4 muestras de pacientes y controles, respectivamente. Colores negros y grises para controles y resto de colores para pacientes

Estos resultados muestran el correcto aislamiento y separación de dos poblaciones de VE en orina y plasma, exosomas y microvesículas, mediante su caracterización proteica, concentración y tamaño diferenciados.

4. ESTUDIO DEL ARN PRESENTE EN LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES URINARIAS

4.1. Estudio cualitativo del ARN vesicular

Se llevó a cabo un estudio cualitativo del ARN presente en las VE y para ello se corrieron muestras representativas de ARN obtenido de varias fracciones de la orina (orina libre de células, fracción exosomal y sobrenadante libre de exosomas) en un sistema de electroforesis capilar *Bioanalyzer 2100* (Agilent). Concretamente, se utilizó el *RNA Pico chip* debido a la baja concentración de ARN total esperado para este tipo de muestras. Los perfiles obtenidos se muestran en la Figura R7 donde se observa un predominio de las especies correspondientes a ARN pequeño (ARNp < 200 nt) en la fracción exosomal respecto al encontrado en el *pellet* celular urinario. Al comparar la concentración de ARNp en las diferentes fracciones de la orina, se obtuvo el valor más alto para los exosomas (361 pg/μL), seguido de la orina libre de células (202 pg/μL) y el sobrenadante libre de exosomas (41 pg/μL).

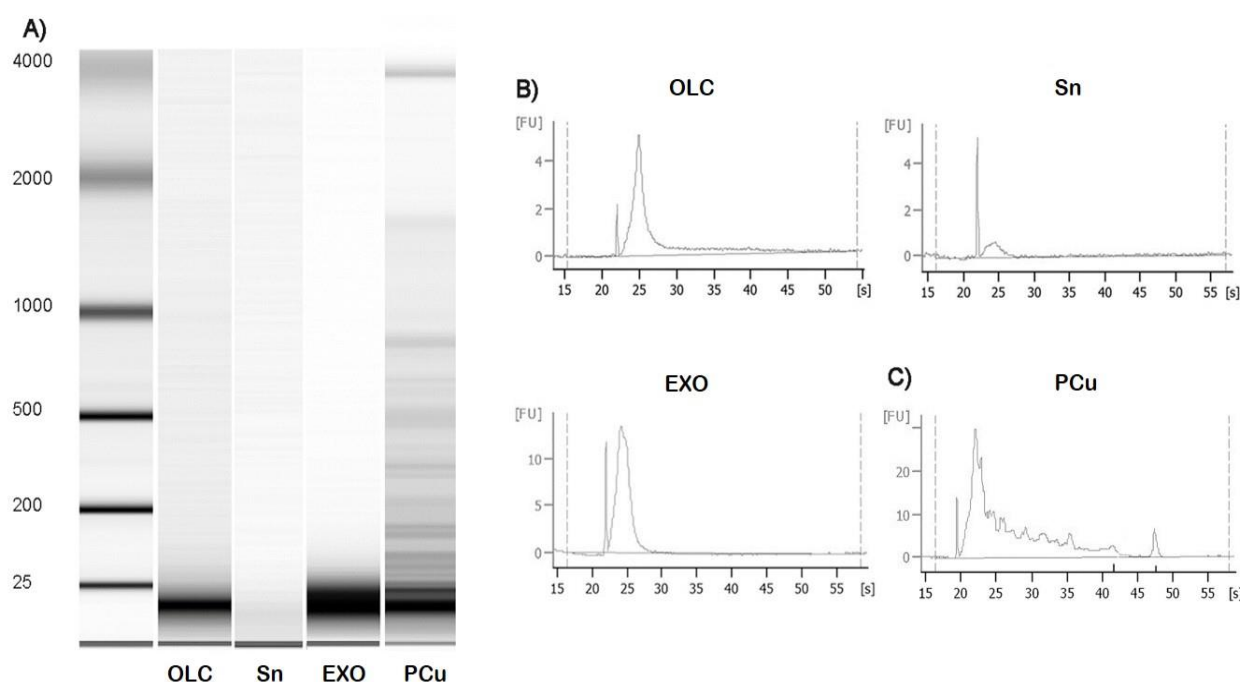


Figura R7. Perfiles representativos de ARN total aislado de diversos componentes de la orina mediante Agilent RNA Pico Chip. **A)** La mayor parte del ARN exosomal se encontró en la fracción de ARN pequeños (< 200 nt). **B)** Electroferogramas correspondientes a varios componentes de la orina: orina libre de células (OLC), sobrenadante libre de exosomas (Sn) y exosomas (EXO). **C)** Electroferograma correspondiente al *pellet* celular urinario (PCu) donde se observa una gran variedad de tamaños de ARN. La baja intensidad de los picos correspondientes a ARN ribosomal 18S y 28S sugiere la degradación parcial del ARN celular urinario.

4.2. Estudio cuantitativo del ARN vesicular

Por otro lado, se quiso analizar la posibilidad de cuantificar niveles de miARNs en ambos tipos de VE de orina y observar si su distribución cambiaba en pacientes con daño renal incipiente. De este modo, se llevaron a cabo cuantificaciones mediante RT-q PCR de dos miARN en exosomas y microvesículas de la orina correspondientes a la población principal de estudio (n=52). Concretamente, se estudiaron los niveles de miR-335*, miARN descrito previamente como abundante en orina (Weber et al., 2010) y miR-146a, cuyo aumento en enfermedades renales había sido descrito anteriormente (Ramachandran et al., 2013). Además, nuestro grupo había cuantificado estos miARNs previamente en exosomas de otra cohorte de pacientes con proteinuria.

Los valores de de miR-335* y miR-146a se normalizaron por la cantidad de *spike-in* cel-miR-39 y el *fold change* se representó relativo a los valores medidos en microvesículas. Teniendo en cuenta a toda la población, se obtuvo un aumento significativo en la cantidad de miR-335* (12,8 veces más; $p < 0,0001$) y miR-146a (12,1 veces más; $p < 0,0001$) presente en exosomas frente a microvesículas. Por lo que respecta a los valores obtenidos en cada grupo de estudio, en la Figura R8 se observa un aumento significativo en la cantidad de miR-335* y miR-146a en los exosomas frente a microvesículas en el grupo NO MALB, con un *fold change* muy similar (casi 10 veces más; $p < 0,0001$). De manera similar, en los exosomas del grupo MALB, se produjo un aumento significativo de 11 veces tanto para miR-146a como para miR-335* (Figura R8).

Por último, al comparar los valores exosomales y microvesiculares entre grupos, se obtuvo un descenso significativo del 60% ($p < 0,001$) sólo en los niveles exosomales de miR-146a dentro del grupo MALB. Sin embargo, ni los valores exosomales de miR-335* ni tampoco los microvesiculares se vieron afectados por la presencia de microalbuminuria (Figura R9).

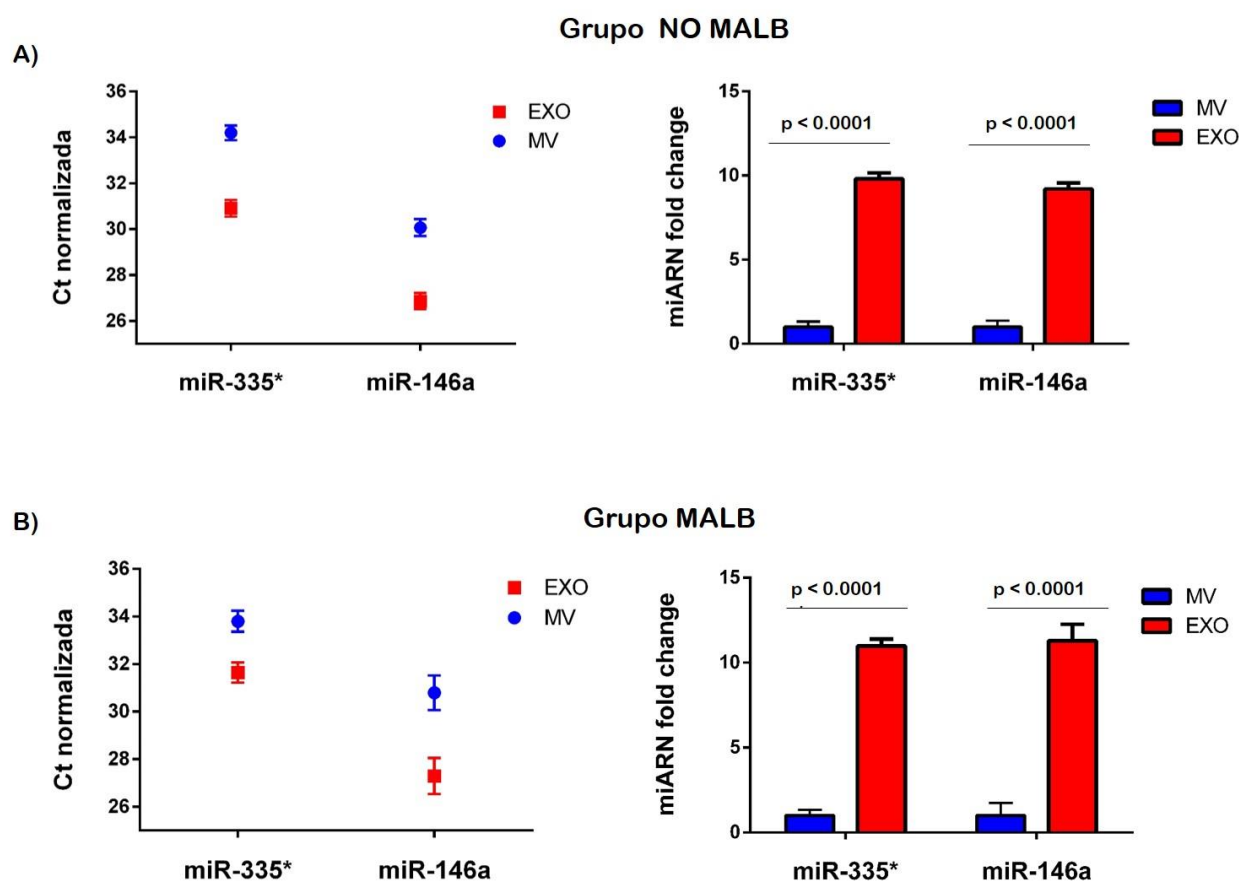


Figura R8. Comparación de los niveles de miR-335* y miR-146a entre exosomas y microvesículas urinarias para cada grupo de estudio. Cambios expresados en número de Ct normalizada (izquierda) y fold change relativo calculado mediante $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (derecha). A) Grupo normoalbuminúrico (NO MALB). B) Grupo con excreción urinaria de albúmina aumentada (MALB). Datos representados como media \pm ESM.

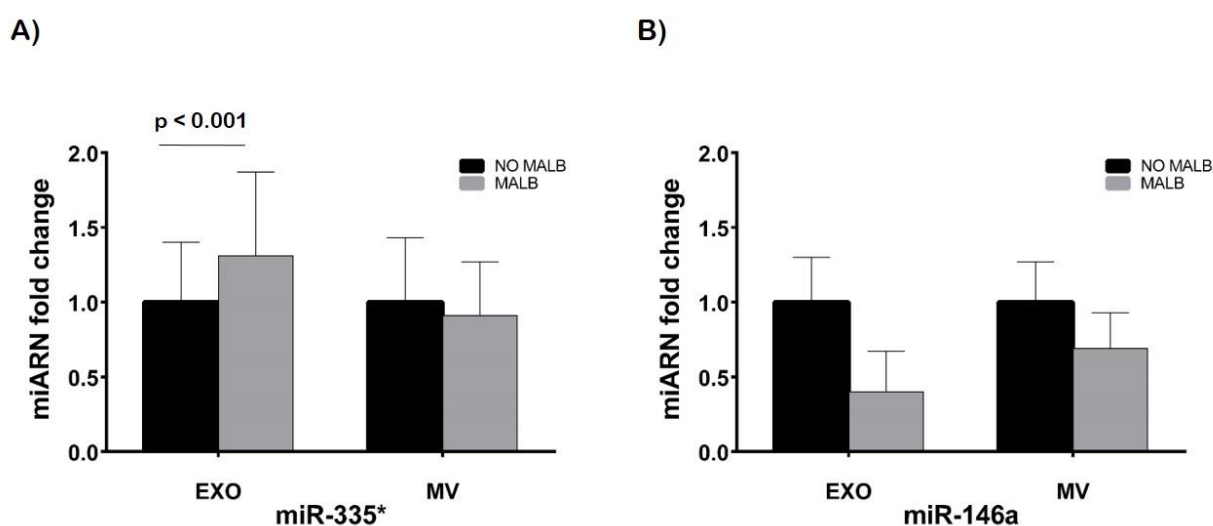


Figura R9. Comparación de los niveles exosomales y microvesiculares de miR-335* y miR-146a en presencia de microalbuminuria. Cambios expresados como *fold change* relativo calculado mediante $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A) miR-335*; B) miR-146a. Datos representados como media \pm ESM.

Los estudios cualitativos y cuantitativos del ARN vesicular mostraron que las VE presentan perfiles de ARN específicos y distintos a los encontrados en el *pellet* celular. En estas predominan especies correspondientes a la fracción de ARNp (*small*), caracterizada por tamaños < 200 nt. Por su parte, los niveles exosomales de miR-335* y miR-146a aumentaron con respecto a los obtenidos en microvesículas para ambos grupos de enfermedad. Además, al comparar los niveles exosomales entre grupos se obtuvo un descenso significativo del 60% de miR-146a en el grupo MALB. De este modo, la presencia de una elevada excreción de albumina podría condicionar el perfil de miARNs transportados por los exosomas.

5. OPTIMIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS DE ARN PEQUEÑOS PARA SECUENCIACIÓN MASIVA PROVENIENTES DE VESÍCULAS EXTRACELULARES Y PLASMA

El ARN vesicular presenta un enriquecimiento en la fracción *small* y, generalmente, el rendimiento de la extracción de ARN de un *pellet* rico en VE o plasma, suele ser menor si se compara con el obtenido de *pellet* celular o tejido. Estas diferencias en el material de partida, hacen de la puesta a punto de la preparación de librerías de ARNp un proceso esencial a la hora de generar datos de secuenciación fiables.

Durante el proceso de puesta a punto, tres kits comerciales fueron utilizados: “TruSeq” de *Illumina*, “NEBNext” de *New England Biolabs* y “CleanTag” de *TriLink Biotechnologies*. Finalmente, este último fue el escogido debido a que conseguía generar fragmentos de librerías de casi todas las muestras de VE y plasma, mientras que el resto sólo generaba dímeros de adaptador para un porcentaje de estas.

5.1. Controles de calidad y purificación en gel

Establecer controles de calidad para detectar la presencia de dímeros de adaptador y purificar la librería en gel de poliacrilamida para poder deshacerse de estos, fueron los pasos clave para optimizar las librerías generadas a partir de ARN vesicular y plasmático. Estos controles se llevaron a cabo en el secuenciador capilar ABI 3730. En la figura R10 se muestran cuatro perfiles característicos de las librerías obtenidas, con diferentes

intensidades y tamaño de picos según su porcentaje de ARNp incorporado (picos entre 135 pb y 155 pb) y dímeros de adaptador inespecífico (picos a 110 – 120 pb).

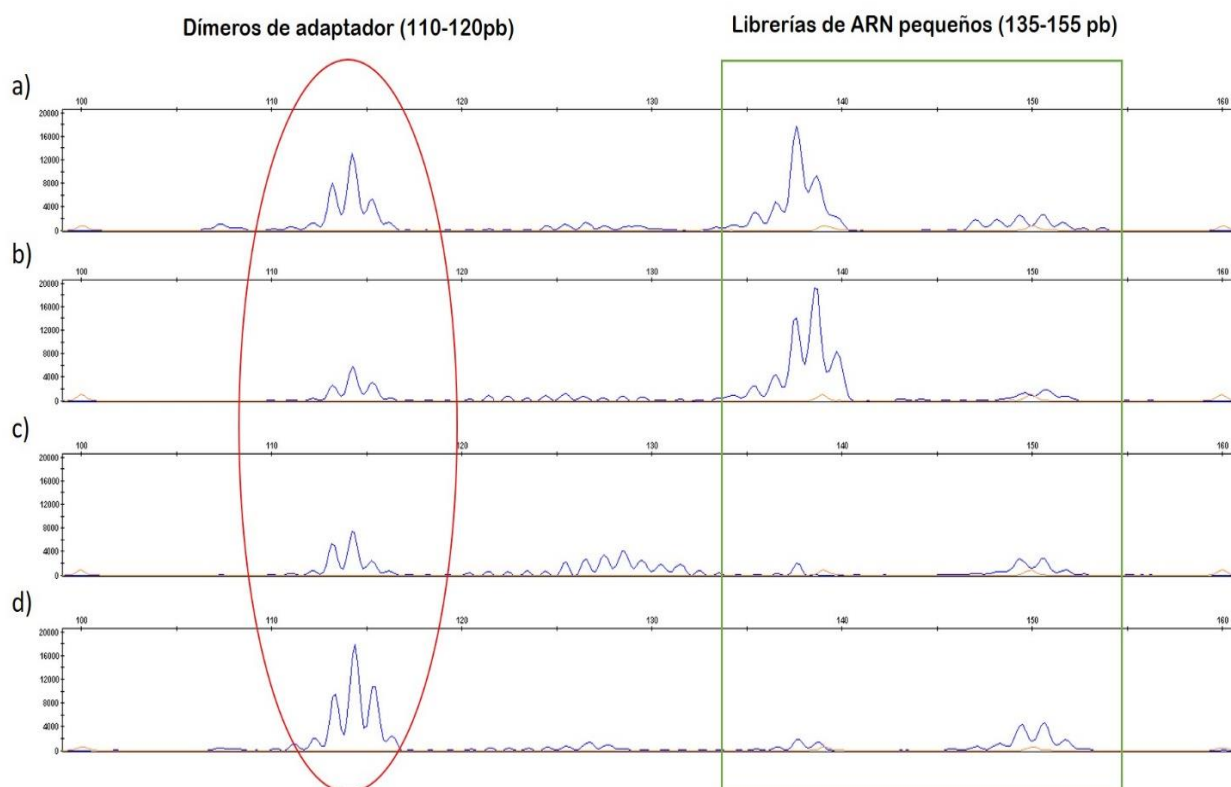
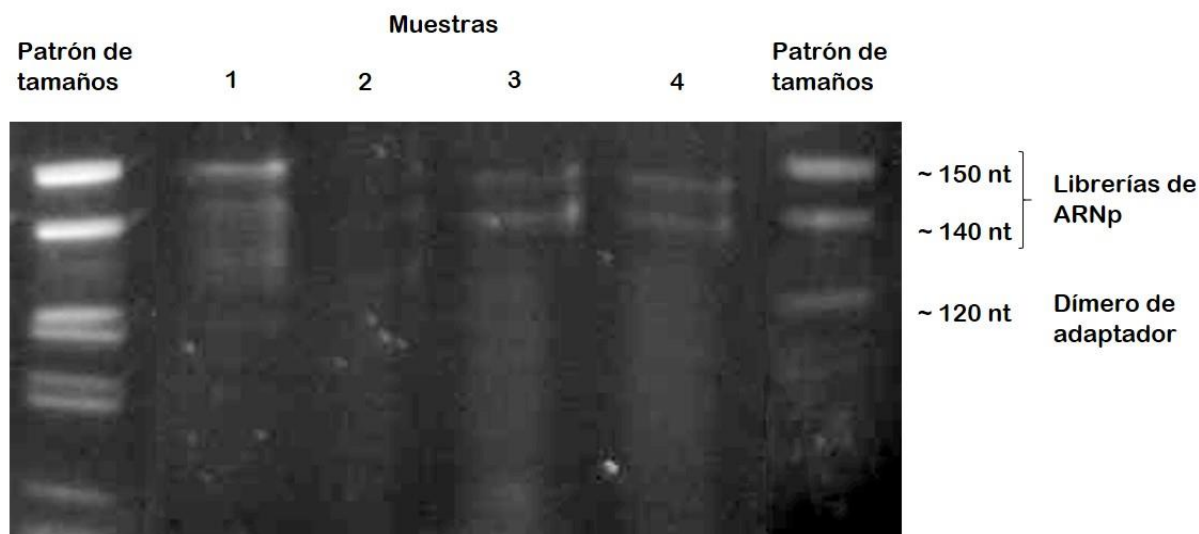


Figura R10. Evaluación de los diferentes perfiles de librerías obtenidos al realizar el primer control de calidad por secuenciación capilar. A-B) Se muestran dos ejemplos representativos de buena calidad con alta intensidad de los picos correspondientes a ARNp y diferente intensidad de la zona de dímero de adaptador, alta (a) o moderada (b). C-D) Se muestran dos ejemplos con poca presencia de librerías de ARNp y, por tanto baja intensidad de picos en la zona 135-155 pb, junto a intensidades de dímeros de adaptador baja (c) o alta (d).

Posteriormente, se corrieron las muestras en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (urea) para poder obtener los fragmentos de librería y eliminar los fragmentos inespecíficos correspondientes a dímeros de adaptador. En la figura R11 se muestra el patrón de tamaños obtenidos tras la tinción del gel con un agente intercalante fluorescente. Se utilizaron marcadores de tamaño que acotaran la zona 135 – 155 pb y así poder asegurar un correcto corte de la banda correspondiente a las librerías de ARNp. Por último, se muestra un ejemplo de control de calidad final tras la purificación en gel en el que se confirma la correcta selección por tamaño realizada en el paso anterior (figura 11B).

A)



B)

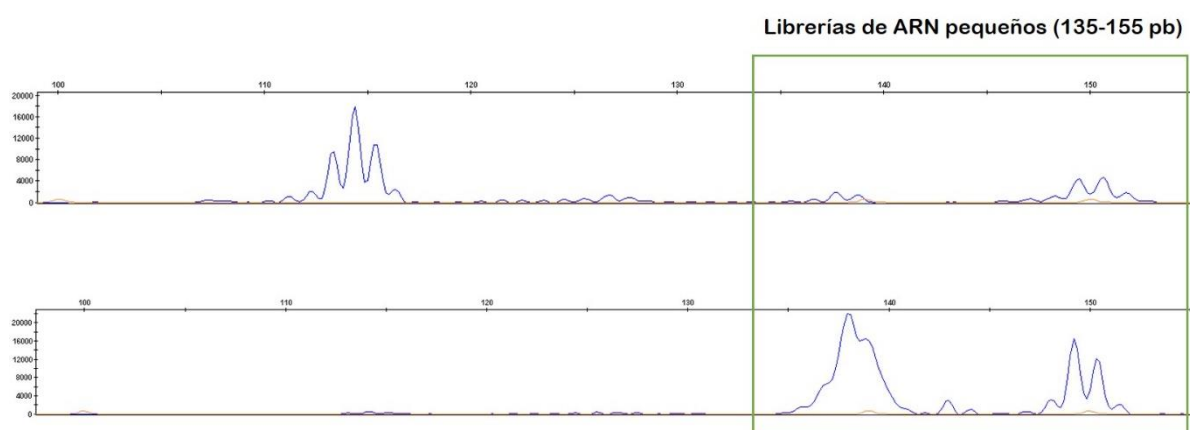


Figura R11. Imagen de librerías de ARNp corridas en gel de poliacrilamida desnaturizante y control de calidad final tras corte de bandas del gel. A) Se muestran cuatro ejemplos representativos de las imágenes obtenidas al correr las librerías de exosomas en geles desnaturizantes, así como dos patrones de referencia o *ladder* en los extremos que marcan la zona a cortar. **B)** Perfil del control de calidad inicial (arriba) y control de calidad final tras la selección por tamaño aplicada al purificar en gel y reamplificar (abajo). Se observa como el dímero de adaptador es eliminado y sólo aparecen picos correspondientes a librerías de ARNp (135-155pb).

5.2. Aumento del número de lecturas de miARN y otros ARN pequeños en exosomas

Para poder evaluar la mejora obtenida al utilizar el proceso de optimización en la preparación librerías de ARN aislado de VE y plasma, se secuenciaron 24 muestras provenientes de ARN exosomal siguiendo el protocolo descrito y las mismas 24 muestras sin llevar a cabo la purificación de los fragmentos formados entre 137 – 152 pb y, por tanto, sin eliminar los dímeros de adaptador.

Inicialmente se comparó la cantidad de lecturas totales correspondientes a miARNs en el grupo purificado (P) frente a las obtenidas en el grupo control no purificado (NP). Los resultados muestran un total de casi 40 millones de lecturas para el grupo P frente a 25 millones para el grupo NP. Esto supone un incremento del 62,5% de lecturas en el grupo de muestras que han sido purificadas. Además, el porcentaje de lecturas de miARNs frente al de lecturas totales también aumentó, obteniéndose un 31% en el grupo P frente al 18% del NP. Asimismo, para medir el posible efecto de sesgo o cambio producido por el protocolo de optimización en los tipos de miARN obtenidos en la secuenciación, se compararon las lecturas obtenidas para cada miARN específico en cada grupo. La Figura R12 muestra que las poblaciones de miARN eran muy similares en ambos grupos, obteniéndose un coeficiente de determinación $R^2 = 0,96$ y p valor $< 0,001$.

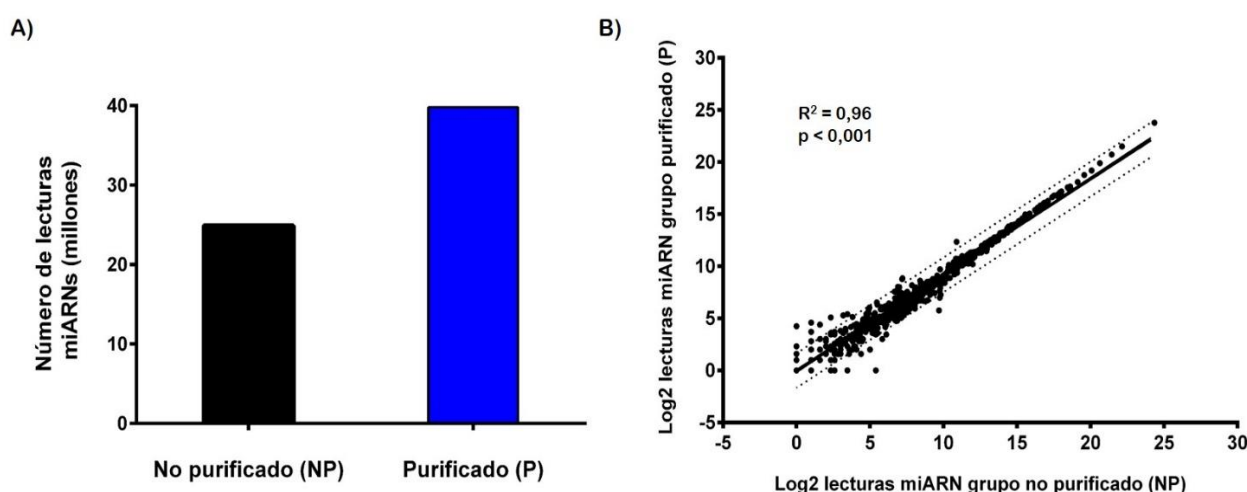


Figura R12. Mejora en el número de lecturas de miARNs al aplicar el protocolo de optimización sin producir sesgo en los miARNs secuenciados. Las librerías fueron preparadas según el protocolo del fabricante (NP) u optimizadas con el protocolo de optimización (P). Las muestras se secuenciaron en el equipo HiSeq 2000, 50 ciclos y lectura única. A) Se muestra un aumento del 62,5% de lecturas correspondientes a miARN del grupo purificado frente al grupo control no purificado. B) Correlación del logaritmo en base 2 del número de lecturas para cada miARN dentro de cada grupo. Línea de puntos se corresponde con el IC al 95%.

También se evaluó el impacto de la nueva metodología optimizada en la secuenciación de otros tipos de ARNp que no se correspondían con miARNs. Los resultados obtenidos muestran una mayor sensibilidad también para estos ARNp, obteniéndose más del doble de lecturas totales también en este conjunto ($2,90 \times 10^5$ lecturas para el grupo NP vs $5,98 \times 10^5$ lecturas para el grupo P). Del mismo modo que ocurría con los miARNs, la optimización del protocolo no alteró la distribución del resto de especies de ARNp no codificantes, obteniéndose porcentajes muy similares en los dos

grupos. En ambos casos la mayoría de lecturas mapeaban con ARN Y, seguidos de ARNt y ARNInc. También se obtuvieron de otros ARN como ARNr y ARNm precursor. (Figura R13).

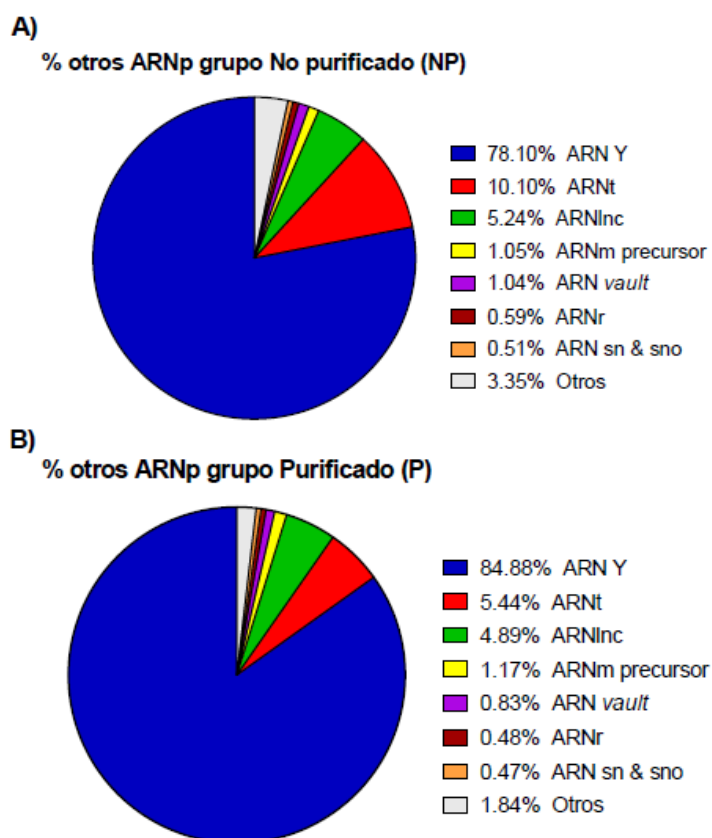


Figura R13. Porcentaje de lecturas obtenidas para otros ARNp.

Las librerías fueron preparadas según el protocolo del fabricante (NP) u optimizadas con el protocolo de optimización (P). Las muestras se secuenciaron en el equipo HiSeq 2000, 50 ciclos y lectura única.

A) Porcentaje de lecturas de cada tipo dentro del grupo NP para un total de 290.000 lecturas. B) Porcentaje de lecturas de cada tipo dentro del grupo P para un total de 598.000 lecturas.

Estos resultados muestran que el proceso de puesta a punto en la generación de librerías ayudó a mejorar la calidad de la secuenciación, generando librerías de ARN exosomales y circulantes incluso con una muy baja cantidad de partida. Además, esta optimización propició un aumento en la profundidad de la secuenciación, obteniéndose un mayor número de lecturas totales tanto para miARNs como para otros tipos de ARNp, además, sin producir ningún sesgo o alteración en la distribución de los diferentes tipos de ARN observados.

6. PERFIL DE MICRO ARNs EXOSOMALES Y PLASMÁTICOS ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE MICROALBUMINURIA EN PACIENTES HIPERTENSOS

6.1. Características generales de la secuenciación

Para poder obtener resultados fiables en la secuenciación y ser capaces de encontrar el mayor número de cambios posibles asociados a la presencia/ausencia de microalbuminuria y no ser producto del sesgo introducido por otra variable, se evaluó la influencia de la edad, género y *lane* del secuenciador, en el número de lecturas de miARNs obtenido en cada grupo de estudio.

En la figura R14 se muestran las lecturas totales de miARN por muestra dentro de cada grupo de estudio para las variables género, edad y número de *lane* del secuenciador. Los resultados obtenidos muestran como ambos grupos son bastante similares entre sí, con un ligero aumento de lecturas en el grupo MALB para todas las condiciones, y la distribución de muestras dentro de cada uno de ellos es homogénea.

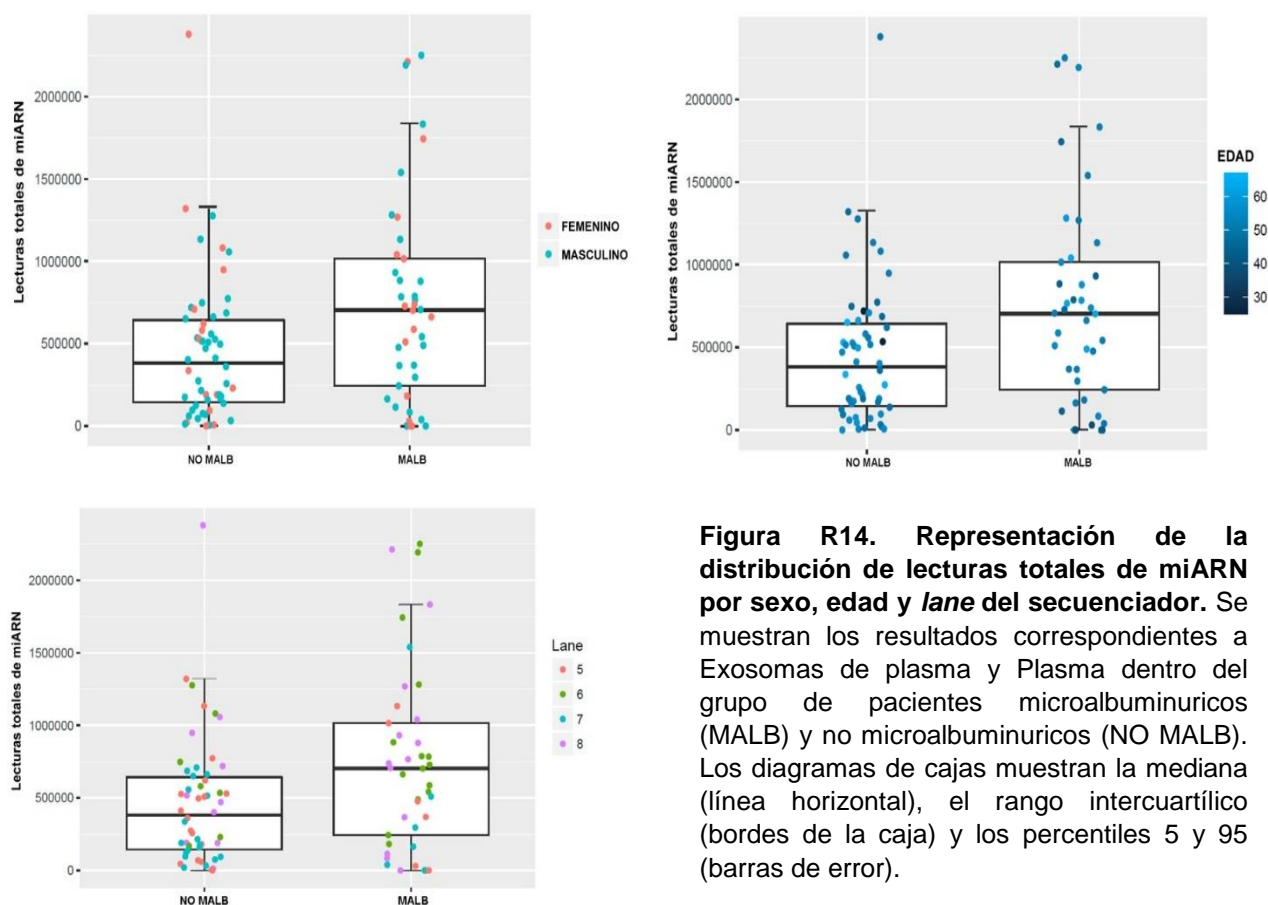


Figura R14. Representación de la distribución de lecturas totales de miARN por sexo, edad y *lane* del secuenciador. Se muestran los resultados correspondientes a Exosomas de plasma y Plasma dentro del grupo de pacientes microalbuminuricos (MALB) y no microalbuminuricos (NO MALB). Los diagramas de cajas muestran la mediana (línea horizontal), el rango intercuartílico (bordes de la caja) y los percentiles 5 y 95 (barras de error).

Por otro lado, también se compararon el número de lecturas obtenido separando los resultados por el tipo de biofluido o fracción estudiada. De este modo, se observó que la distribución de plasma y exosomas de plasma era homogénea para el número de lecturas totales de miARN dentro de cada grupo de estudio (Figura R15). Una vez visto que el tipo de biofluido no alteraba el número de lecturas totales, se quiso evaluar si el número de miARNs diferentes encontrados era similar y homogéneo en exosomas y plasma. De modo interesante los resultados, tanto para el grupo MALB como para NO MALB, muestran una distribución distinta en el número de miARNs diferentes secuenciados. Mientras que para la mayoría de muestras de plasma los valores se agrupan en torno a 600 miARNs diferentes encontrados en cada muestra, en los exosomas se encuentran solamente entre 100 – 300 miARNs únicos.

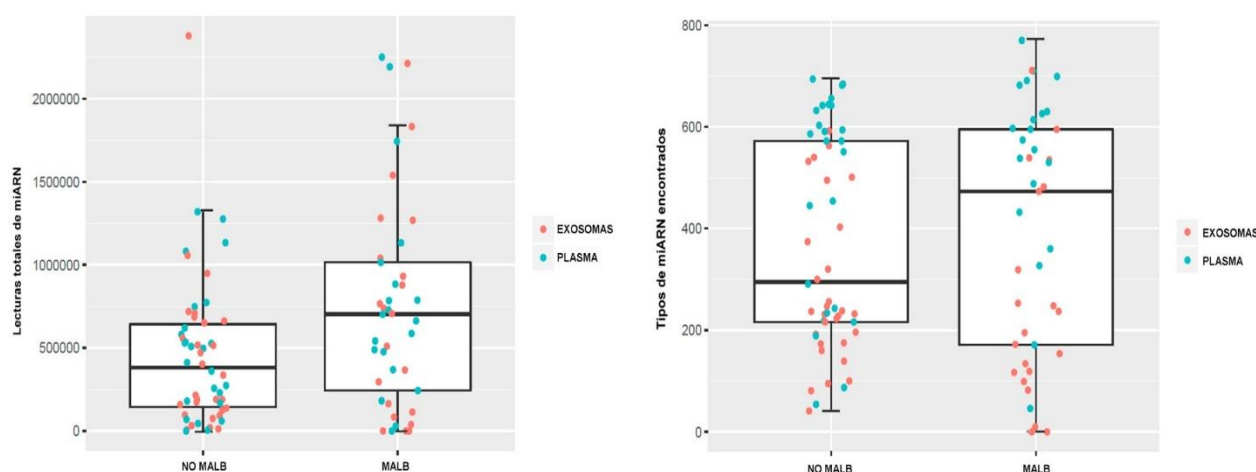


Figura R15. Representación de la distribución de lecturas totales de miARN por biofluido. Se muestran los resultados correspondientes a Exosomas de plasma y Plasma dentro en los pacientes microalbuminuricos (MALB) y no microalbuminuricos (NO MALB). **A)** Distribución homogénea de lecturas de miARNs según la fracción utilizada dentro de cada grupo de pacientes. **B)** Distribución heterogénea de la cantidad de miARNs diferentes encontrados según la fracción utilizada. Los diagramas de cajas muestran la mediana (línea horizontal), rango intercuartílico (bordes de la caja) y los percentiles 5 y 95 (barras de error).

6.2. Análisis de enriquecimiento de micro ARNs en rutas de la base de datos KEGG

Tras el análisis bioinformático de los datos obtenidos por secuenciación masiva, se realizó el análisis de expresión diferencial de miARN en las diferentes fracciones o biofluidos estudiados (plasma, exosomas de plasma y exosomas de orina) comparando los grupos de estudio MALB y NO MALB. De este modo, se obtuvieron un total de 146 miARN diferencialmente expresados con $p < 0,05$ (Anexo 1).

En la figura R16 se muestra la distribución de los miARN significativos encontrados dentro de cada una de las tres fracciones. La mayoría de los miARN diferencialmente expresados se encontraron en plasma y exosomas de plasma. Además, este tipo de diagramas permite conocer las zonas de intersección y de ellas se obtuvo que plasma y exosomas de plasma compartían 9 miARN mientras que los dos tipos de exosomas apenas compartían 1 miARN (miR-26a-5p), lo mismo pasaba en la zona de intersección entre las tres fracciones, donde sólo se encontró let-7e-5p.

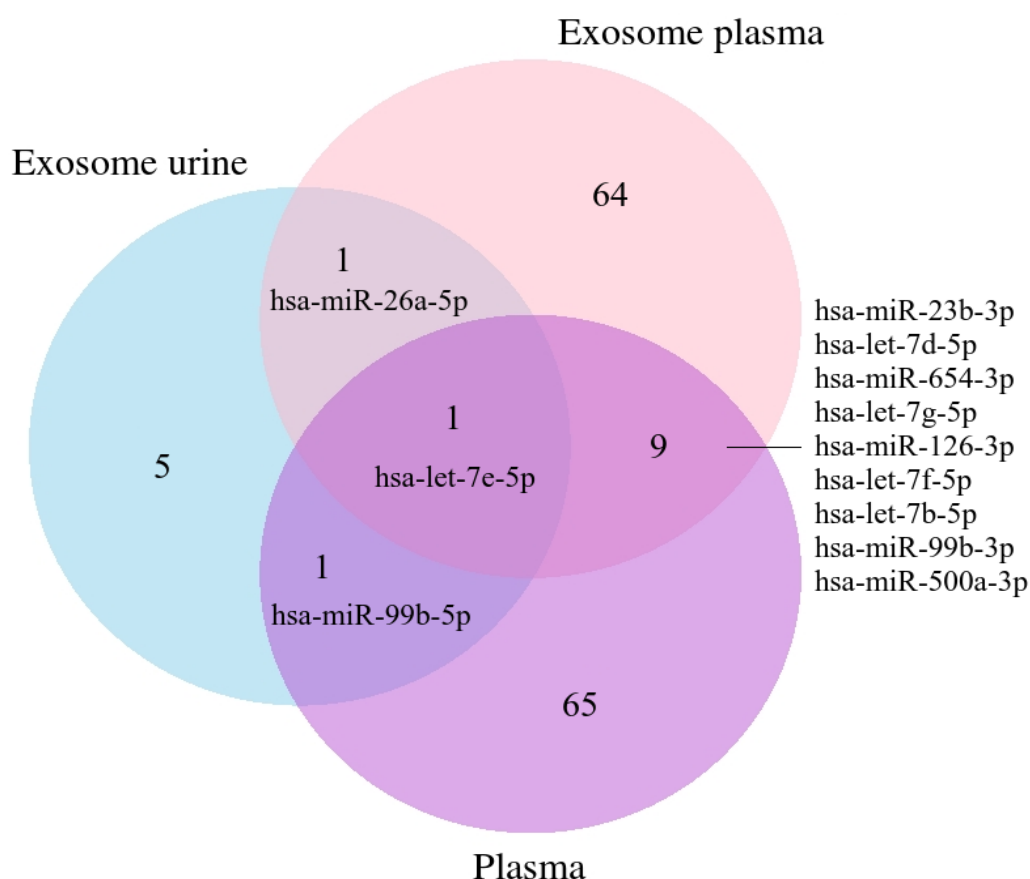


Figura R16. Diagrama de Venn que representa la localización de los miARN diferencialmente expresados al comparar al grupo de pacientes hipertensos con microalbuminuria (MALB) frente a los no microalbuminúricos (NO MALB). Se representa cada fracción con un color y el número total de miARNs obtenido. Las zonas de intersección entre fluidos o fracciones incluyen además el nombre de los miARNs correspondientes. hsa: homo sapiens; miR: micro ARN.

Además, también se llevó a cabo en paralelo un análisis de comparaciones múltiples donde se comparó cada fracción de estudio frente a las otras dos (P vs Exo P; P vs Exo O y Exo P vs Exo O). Las comparaciones se hicieron para todos los pacientes en conjunto y también por separado utilizando solamente los pacientes de cada grupo

(MALB o NO MALB). Los listados de miARNs diferencialmente expresados para estas comparaciones se puede consultar en el Anexo 2.

El objetivo de estas comparaciones fue descubrir si algún miARN de los diferencialmente expresados inicialmente, al comparar MALB y NO MALB en cada fracción por separado, se encontraba en este caso en la intersección entre grupos de enfermedad y, por tanto, no parecía estar asociado directamente a la presencia o ausencia de microalbuminuria sino a otro tipo factores biológicos. En la Figura R17 se muestra la distribución de miARNs diferencialmente expresados obtenidos en las comparaciones múltiples. Se observa como la mayor zona de interacción se da al comparar Plasma vs Exosomas de Plasma (13 miARN comunes en ambos grupos de enfermedad), seguido de la comparación Exosomas de Plasma vs Exosomas de Orina (3 miARN comunes). Al comparar los fluidos Plasma vs Exosomas de Orina no se encontró ningún miARN diferencialmente expresado compartido en ambos grupos de pacientes.

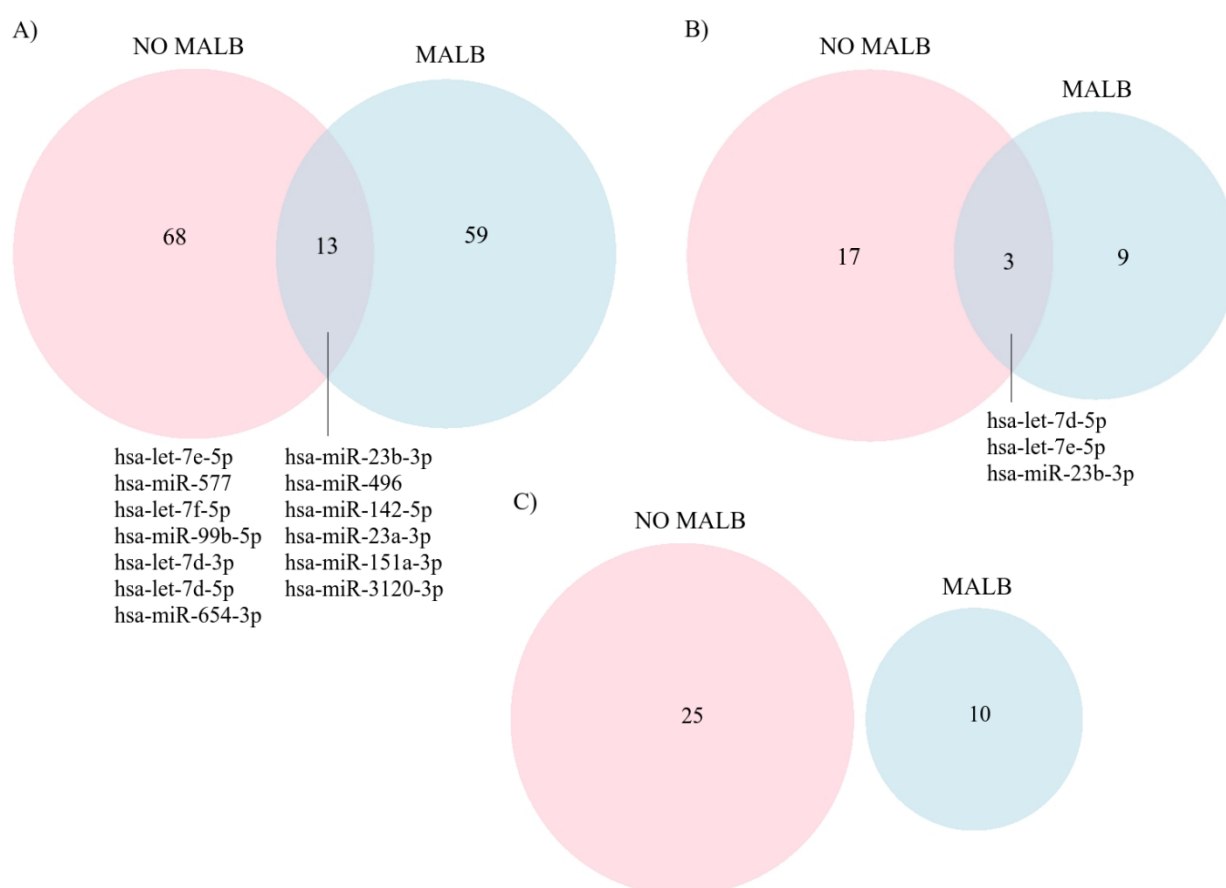


Figura R17. Comparaciones múltiples entre las diferentes fracciones de estudio. A) Plasma vs Exosomas Plasma; B) Exosomas Plasma vs Exosomas Orina; C) Plasma vs Exosomas Orina. Los miARN diferencialmente expresados en cada comparación se muestran en número dentro de cada grupo de pacientes (NO MALB, rosa; MALB, azul). El tamaño del círculo es proporcional al número de miARNs existente. Las zonas de intersección incluyen además el nombre de los miARNs correspondientes. hsa: homo sapiens; miR: micro ARN.

Una vez llevado a cabo el análisis de comparaciones múltiples, se encontraron 16 miARNs comunes comprendidos en las intersecciones entre los dos grupos de pacientes, de los cuáles 3 aparecían repetidos. Al comparar estos 13 miARNs únicos con el listado inicial de miARNs diferencialmente expresado obtenido dentro de cada fracción (Figura R18), se comprobó que había un total de 10 miARN coincidentes. Así pues, estos 10 miARN fueron eliminados antes de proseguir con el análisis de enriquecimiento. En la figura R18 se representa el diagrama de Venn resultante con los 136 miARNs diferencialmente expresados finalmente utilizados. Se observa como las zonas de intersección varían ligeramente, siendo el cambio más destacado la desaparición de miARNs presentes al mismo tiempo en las fracciones de Exosomas de orina y Plasma (Figura R18).

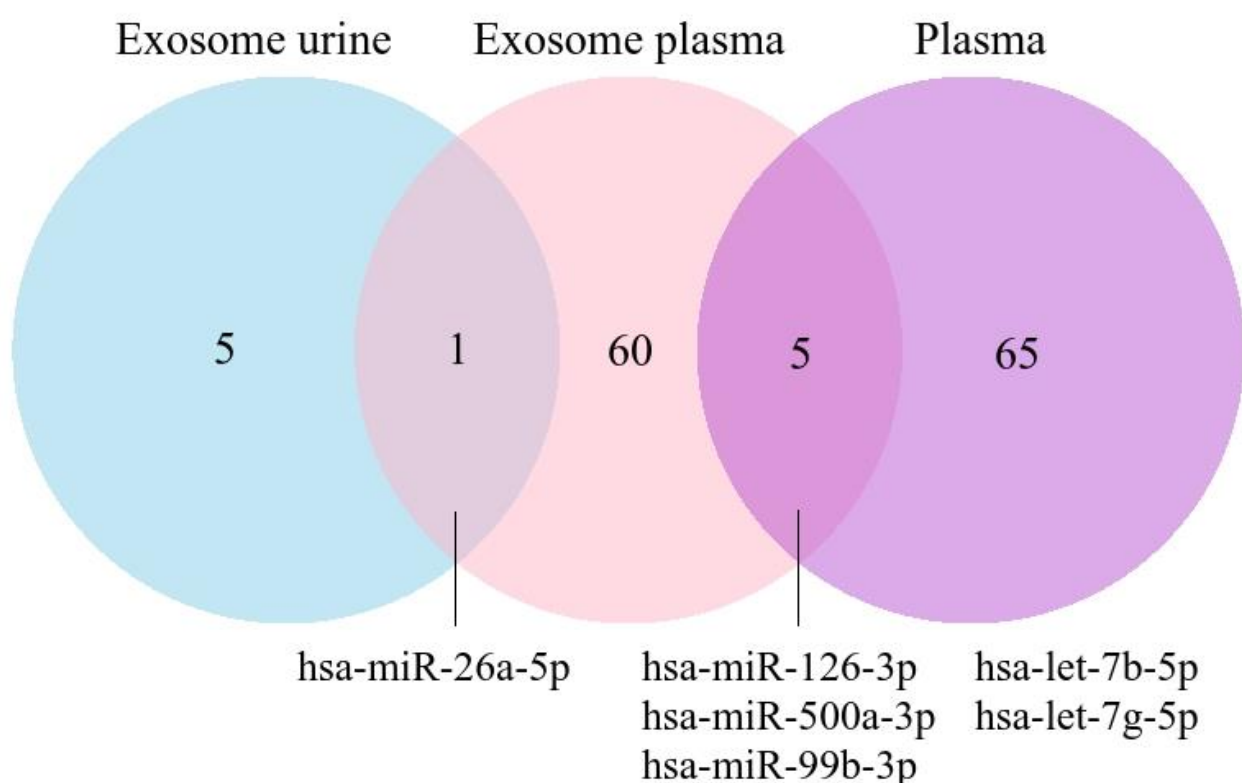


Figura R18. Diagrama de Venn final que representa la localización de los miARN diferencialmente expresados al comparar al grupo de pacientes hipertensos con microalbuminuria (MALB) frente a los no microalbuminúricos (NO MALB). Se representa cada fracción con un color y el número total de miARNs obtenido. Las zonas de intersección entre fluidos o fracciones incluyen además el nombre de los miARNs correspondientes. hsa: homo sapiens; miR: micro ARN.

Tras aplicar este filtro, los 136 miARNs obtenidos fueron representados en un gráfico de volcán, donde cada miARN viene representado por un punto. Las coordenadas X de cada punto se corresponden con el valor de *fold change* (log2Fold Change) mientras

que las coordenadas Y representan su correspondiente tasa de falso descubrimiento ($-\log_{10}(\text{FDR})$). Este tipo de gráficos permite identificar fácilmente los cambios más significativos dentro de un conjunto de puntos ya que combina la significación estadística con la magnitud del cambio, permitiendo encontrar rápidamente los valores más alejados de la zona central (Figura R19).

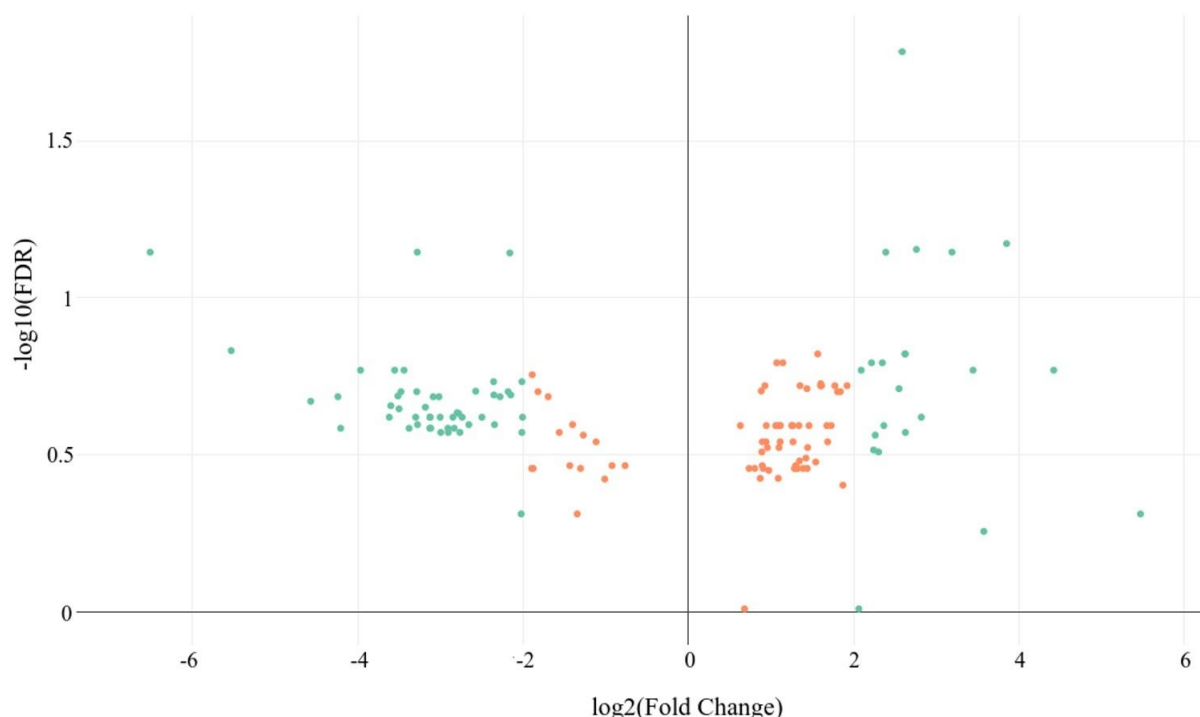


Figura R19. Gráfico tipo “volcano” que representa los miARN diferencialmente expresados al comparar al grupo de pacientes hipertensos con microalbuminuria (MALB) frente a los no microalbuminúricos (NO MALB). Se representan los valores del logaritmo en base 2 del *fold change* frente al - logaritmo en base 10 del FDR (*False Discovery Rate*). En color verde se muestran los miARNs con $\log_2(\text{FC}) \geq 2$ o ≤ -2 , seleccionados, y en color naranja el resto.

El siguiente filtro que se llevó a cabo fue el de seleccionar sólo aquellos miARNs con un $\log_2(\text{Fold change}) \geq 2$ o ≤ -2 (representados en verde en la figura R19). Así pues, de los 136 miARNs diferencialmente expresados con $p < 0,05$, solamente 73 fueron utilizados en el análisis de enriquecimiento posterior para obtener una red o mapa de interacción entre los miARNs asociados a la presencia/ausencia de microalbuminuria y los procesos biológicos en los que están implicados.

En la tabla R3 se muestra un resumen con los 136 miARNs diferencialmente expresados y en qué fracción de estudio (exosomas plasma, plasma o exosomas orina) se encontraban. Además, se incluye un asterisco y negrita para destacar aquellos 73

miARN con $\log_2(\text{Fold change}) \geq 2$ o ≤ -2 que fueron utilizados posteriormente en el análisis de enriquecimiento.

Tabla R3. Listado de 136 miARNs expresados diferencialmente al comparar MALB vs NO MALB. Los miARN se dividen por fracción de estudio, además, se marcan con un asterisco y en negrita (*) los que presentan un $\log_2(\text{FC}) \geq 2$ o ≤ -2 .

miARN sólo en Exosomas de orina				
hsa-miR-934*	hsa-miR-7706*	hsa-miR-143-3p*	hsa-miR-92b-3p	hsa-miR-146a-5p
miARN sólo en Exosomas de plasma				
hsa-miR-103a-3p*	hsa-miR-107	hsa-miR-1185-1-3p*	hsa-miR-1185-2-3p*	hsa-miR-122-5p*
hsa-miR-125b-2-3p*	hsa-miR-126-5p*	Hsa-miR-1270*	hsa-miR-1306-3p*	hsa-miR-140-3p
hsa-miR-140-5p*	hsa-miR-141-3p*	hsa-miR-144-3p*	hsa-miR-148b-5p*	hsa-miR-181a-2-3p*
hsa-miR-190b*	hsa-miR-191-3p*	hsa-miR-191-5p*	hsa-miR-194-5p*	hsa-miR-199b-5p*
hsa-miR-200a-3p*	hsa-miR-200b-3p*	hsa-miR-203a-3p*	hsa-miR-204-5p*	hsa-miR-222-3p*
hsa-miR-223-3p*	hsa-miR-2467-5p*	hsa-miR-26b-5p*	hsa-miR-30a-3p*	hsa-miR-30a-5p*
hsa-miR-30e-3p*	hsa-miR-31-5p*	Hsa-miR-326*	hsa-miR-337-5p*	hsa-miR-340-5p
hsa-miR-345-5p	hsa-miR-34a-5p*	hsa-miR-3613-5p*	hsa-miR-370-3p*	Hsa-miR-375*
hsa-miR-381-3p*	hsa-miR-409-5p*	hsa-miR-412-5p*	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-425-5p
Hsa-miR-429*	hsa-miR-452-5p*	hsa-miR-504-5p*	hsa-miR-539-3p*	hsa-miR-598-3p*
hsa-miR-627-5p*	hsa-miR-656-3p*	hsa-miR-6816-3p*	hsa-miR-6837-3p*	hsa-miR-6852-5p*
hsa-miR-7-5p*	hsa-miR-92a-1-5p*	hsa-miR-98-3p*	hsa-miR-99a-5p*	hsa-miR-363-3p*
miARN sólo en Plasma				
hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-651-5p	hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-3605-5p	hsa-miR-1307-5p
hsa-miR-6825-5p	hsa-miR-374a-5p*	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-4796-5p	hsa-miR-625-5p
hsa-miR-758-3p	hsa-miR-6758-5p	hsa-miR-4446-3p	hsa-let-7a-5p	hsa-let-7c-5p
hsa-miR-539-5p	hsa-miR-224-5p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-744-5p
hsa-miR-4775	hsa-miR-301a-3p	hsa-miR-376c-3p*	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-337-3p*
hsa-miR-320a	hsa-miR-486-3p*	hsa-miR-6516-5p	hsa-miR-1307-3p	hsa-miR-154-3p*
hsa-miR-939-5p	hsa-miR-5584-5p*	hsa-miR-221-5p	hsa-miR-136-3p	hsa-miR-4511
hsa-miR-411-3p	hsa-miR-2116-3p	hsa-miR-548ax*	hsa-miR-3143	hsa-miR-3138
hsa-miR-664a-3p*	hsa-miR-1260b*	hsa-miR-106b-3p	hsa-miR-664a-5p	hsa-miR-98-5p
hsa-miR-493-5p	hsa-miR-5187-5p	hsa-miR-3176	hsa-miR-4667-5p	hsa-miR-4781-3p
hsa-miR-548l	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-548e-3p*	hsa-miR-628-5p	hsa-miR-556-5p
hsa-miR-889-3p	hsa-miR-6513-3p	hsa-let-7i-5p	Hsa-miR-3161*	hsa-miR-5090
hsa-miR-32-3p	hsa-miR-18a-5p	hsa-miR-3154	hsa-miR-151a-5p	hsa-miR-28-5p
miARN en Exosomas de plasma y Plasma				
hsa-miR-126-3p*	hsa-miR-let-7b-5p	hsa-miR-99b-3p*	hsa-miR-500a-3p*	hsa-let-7g-5p*
miARN en Exosomas de orina y Exosomas de plasma				
		hsa-miR-26a-5p*		

Hsa: homo sapiens; miR: micro ARN.

Finalmente, se llevó a cabo el análisis de enriquecimiento de miARNs diferencialmente expresados con el objetivo de identificar los procesos biológicos o rutas metabólicas principales sobre los que estarían actuando. Para ello se combinaron dos estrategias de análisis. Primero, el listado de miARNs diferencialmente expresados con un $\log_2(\text{FC}) \geq 2$ o ≤ -2 (Figura R18, Tabla R3) fue sometido a un análisis de sobrerrepresentación (Over-Expressed Analysis) y de enriquecimiento de miARN (Gene Set Enrichment Analysis). De este primer paso se obtuvieron un gran número de rutas

metabólicas o procesos biológicos que aparecían enriquecidos. Debido a ello, el siguiente paso consistió en realizar una selección de rutas metabólicas a juicio de experto (data curation) para poder ajustar los resultados obtenidos a la presencia/ausencia de microalbuminuria en la hipertensión. En este paso se eliminaron aquellos miARNs que interaccionaban principalmente con otro tipo de enfermedades como neuronales, diversos tipos de cáncer y parasitarias, entre otras. De este modo se seleccionaron 29 miARNs, los cuáles fueron contrastados con la base de datos KEGG *Pathway* (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y se seleccionaron sólo las rutas en común de ambos análisis (Tablas R4 y R5). En la Figura R20 se muestra la expresión diferencial de cada miARN participante en la red de interacciones miARN – rutas de KEGG.

Tabla R4. Listado de 29 miARNs obtenidos tras realizar el análisis de sobrerepresentación y de enriquecimiento y filtrar las enfermedades no relacionadas con la presencia/ausencia de microalbuminuria en la hipertensión.

miARN sólo en Exosomas de orina				
		hsa-miR-143-3p		
miARN sólo en Exosomas de plasma				
hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-122-5p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-191-5p
hsa-miR-194-5p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-204-5p	hsa-miR-222-3p
hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-30a-3p	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-31-5p	Hsa-miR-326
hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-370-3p	Hsa-miR-375	hsa-miR-504-5p	hsa-miR-598-3p
hsa-miR-7-5p	hsa-miR-99a-5p			
miARN sólo en Plasma				
	hsa-miR-374a-5p	hsa-miR-1260b		
miARN en Exosomas de plasma y Plasma				
	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-99b-3p	hsa-miR-500a-3p	
miARN en Exosomas de orina y Exosomas de plasma				
		hsa-miR-26a-5p		

Hsa: homo sapiens; miR: micro ARN.

micro ARNs significativamente enriquecidos en rutas KEGG

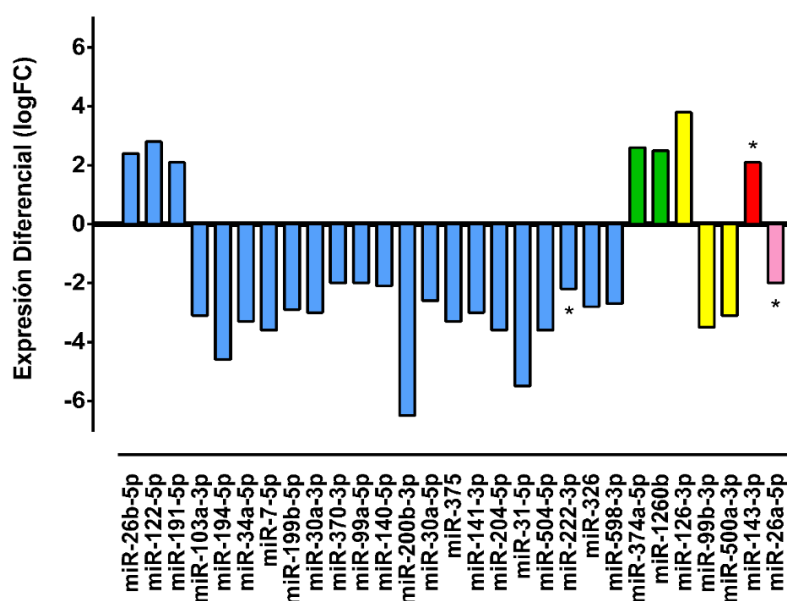


Figura R20. Variación de la expresión diferencial de los 29 miARN que aparecen formando parte de la red de interacción miARN – rutas de KEGG. Se representan los valores del logaritmo en base 2 del *fold change*. Los miARN se representan de distinto color según su localización: azul (Exosomas de plasma); verde (Plasma); amarillo (Exosomas de plasma y Plasma); rojo (Exosomas de Orina) y rosa (Exosomas de orina y Exosomas de plasma). Marcados con un asterisco los seleccionados para la validación.

Tabla R5. Listado de procesos biológicos significativamente enriquecidos tras realizar el análisis de sobrerepresentación y de enriquecimiento y filtrar las enfermedades no relacionadas con la presencia/ausencia de microalbuminuria en la hipertensión.

Proceso biológico	p valor (análisis de sobrerepresentación)
Ciclo celular	2,80E-07
Vía de señalización de MAPK	7,36E-06
Interacción citoquina - receptor	1,35E-05
Diabetes tipo 2	1,35E-05
Vía de señalización de TFG- β	3,74E-05
Uniones de adherencia	4,45E-05
Vía de señalización de insulina	4,45E-05
Regulación del citoesqueleto de actina	4,49E-05
Uniones estrechas	6,61E-04
Reabsorción de Na regulada por aldosterona	1,02E-03
Interacción receptor matriz extracelular	1,14E-03
Vía de señalización de calcio	1,16E-03
Uniones focales	1,54E-03
Vía de señalización de p53	1,58E-03
Endocitosis	3,06E-03
Apoptosis	3,40E-03
Vía de señalización de VEGF	4,11E-03
Moléculas de adhesión celular (CAMs)	7,44E-03
Contracción músculo liso vascular	1,53E-02
Metabolismo de ácidos grasos	1,61E-02
Lisosoma	1,62E-02
Transporte activo de proteínas	4,93E-02
Sistema renina-angiotensina	> 0,05
Reabsorción de agua regulada por vasopresina	> 0,05
Metabolismo de nucleótidos monosacáridos	> 0,05

Por último, en la Figura R21 se muestra la representación de la red de interacciones entre los miARNs diferencialmente expresados y las rutas o procesos biológicos de la base de datos de KEGG. Mientras los miARN se representan en círculos de colores según el biofluido o fracción de estudio en el que se encuentran, las rutas de la base de datos de KEGG vienen identificadas por círculos blancos. Las interacciones de cada miARN en la ruta vienen señaladas por líneas y flechas, siendo el tamaño de los círculos proporcional al número de interacciones miARN – proceso biológico en ambos casos.

En la red de interacciones también se incluyeron otros procesos biológicos o vías metabólicas específicas conocidas por su relación con la hipertensión que presentaban todos nuestros pacientes. Así, se incluyeron las interacciones con el sistema renina-angiotensina-aldosterona, la reabsorción regulada por vasopresina, la vía de señalización de la insulina y la diabetes tipo 2 (Figura R21).

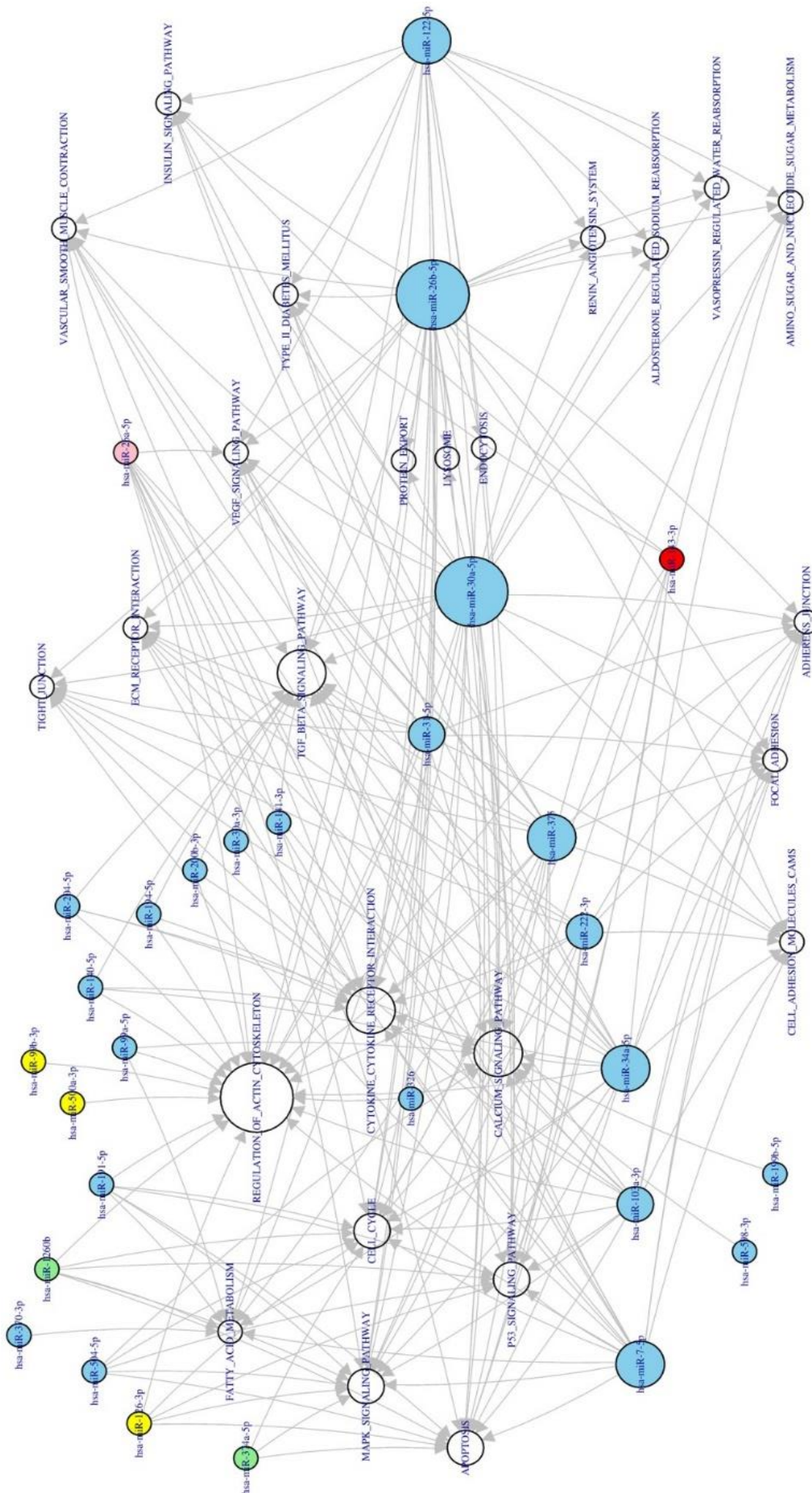


Figura R21. Análisis de enriquecimiento de los miARNs obtenidos en las rutas o procesos biológicos de la base de datos de KEGG. En la figura se muestra la red o mapa de interacciones entre los miARNs diferencialmente expresados al comparar MALB vs NO MALB (círculos de colores) y las rutas de KEGG (círculos blancos). Los miARN se representan de distinto color según su localización: rojo (Exosomas de Orina); azul (Exosomas de plasma); rosa (Exosomas de orina y Exosomas de plasma); verde (Plasma); amarillo (Exosomas de plasma y Plasma). En ambos casos, el tamaño de los círculos es proporcional al número de interacciones miARN – rutas de la base de datos de KEGG.

Se observó que las principales vías que interaccionan con el perfil de miARNs obtenido estaban involucradas en la señalización celular (MAPK, calcio, p53), el ciclo celular y la apoptosis, así como la interacción de citoquinas con su receptor y la vía de señalización del TGF- β . Además, también se encontró la interacción con otros procesos celulares más específicos como las uniones adherentes, focales y estrechas, así como con moléculas de adhesión y de la matriz extracelular. De manera interesante, se obtuvo que la ruta o proceso con mayor número de interacciones con el perfil de miARNs fue la regulación del citoesqueleto de actina con un total de 22 miARNs actuando sobre ella.

De este modo, se encontraron un total de 25 procesos biológicos regulados por el perfil de miARNs diferencialmente expresado al comparar los pacientes con y sin microalbuminuria. En la Tabla R6 se muestra un ranking con las funciones biológicas que aparecen reguladas por un mayor número de miARNs del perfil obtenido.

Tabla R6. Ranking de los procesos biológicos o rutas de KEGG regulados por un mayor número de miARNs del perfil obtenido. Se muestran sólo aquellas reguladas por un porcentaje de miARNs > 20%.

Ranking	Proceso Biológico	nº miARNs interactúan	Porcentaje del perfil de miARNs total (%)
1	REGULACIÓN DE CITOESQUELETO DE ACTINA	22	76
2	INTERACCIÓN CITOQUINA - RECEPTOR	17	59
3	VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL TGF- β	16	55
4	VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE CALCIO	16	55
5	VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE MAPK	15	52
6	CICLO CELULAR	15	52
7	APOPTOSIS	14	48
8	VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE P53	14	48
9	METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS	9	31
10	INTERACCIÓN RECEPTOR MATRIZ EXTRACELULAR	8	28
10	MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR (CAMs)	8	28
10	UNIONES ESTRECHAS	8	28
10	UNIONES DE ADHERENCIA	8	28
10	UNIONES FOCALES	8	28
10	CONTRACCIÓN MUSCULO LISO VASCULAR	8	28
10	VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE VEGF	8	28

7. VALIDACIÓN DE MICRO ARNs EXOSOMALES SELECCIONADOS

Tras realizar el análisis de enriquecimiento y obtener el mapa de interacciones de los miARN diferencialmente expresados en los grupos de estudio y las rutas biológicas de KEGG, se seleccionaron varios miARN para su validación por RT-qPCR. La selección se realizó llevando a cabo una búsqueda bibliográfica del conjunto de 29 miARNs obtenidos en el perfil y su relación previa con lesión renal o glomerular, excreción de albumina en orina, hipertensión y endotelio fenestrado.

De este modo, se seleccionaron miR-222-3p (disminución en Exosomas de plasma del grupo MALB con $\text{Log}_2(\text{FC}) = -2,16$), miR-143-3p (aumento en Exosomas de orina del grupo MALB con $\text{Log}_2(\text{FC}) = 2$) y miR-26a-5p (disminución en Exosomas de Plasma y Exosomas de orina del grupo MALB con $\text{Log}_2(\text{FC}) = -2,02$ y $-1,8$, respectivamente). Al utilizar solamente esos miARN de la red de interacciones generada tras el análisis de enriquecimiento, se observó que había varios procesos biológicos sobre los que actuaban dos o incluso los tres seleccionados. Así, los principales procesos biológicos que regulaban estos miARN seleccionados fueron diversas vías de señalización (MAPK, p53, TGF- β), la regulación del citoesqueleto de actina, interacción con receptores de citoquinas y también participación en el ciclo celular (Figura R22).

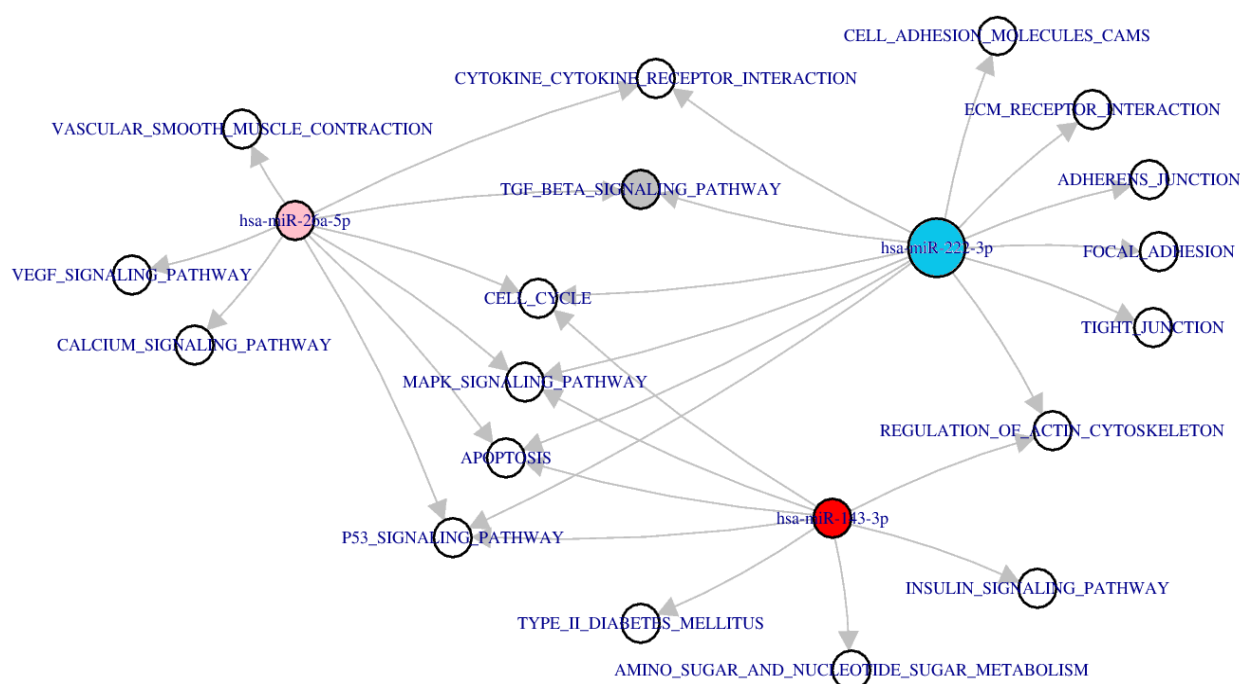


Figura R22. Red de interacciones de los miARNs seleccionados para su validación con las rutas de las bases de datos de KEGG. Los miARNs aparecen en círculos de colores y las rutas de KEGG en círculos blancos. Los miARNs se representan de distinto color según su localización: rojo (Exosomas de orina), azul (Exosomas de plasma), rosa (Exosomas de orina y Exosomas de plasma). En gris se muestra la vía de señalización de TGF- β .

7.1. Cuantificación absoluta de miR-26a-5p, miR-222-3p y miR-143-3p

Por lo que respecta a los Exosomas urinarios, se cuantificó la cantidad de miR-26a-5p, que según los datos de secuenciación mostraba una disminución de 3,5 veces en el grupo MALB; y miR-143-3p, que presentaba un descenso de 4 veces. Al llevar a cabo la cuantificación, en el caso de miR-26a-5p se obtuvo una disminución significativa de 4,65 veces en el grupo MALB frente a la cantidad en NO MALB ($1,56 \times 10^4$ copias vs $7,23 \times 10^4$ copias) (Figura R23). Sin embargo, en el caso de miR-143-3p apenas un 10% de las muestras pudieron ser cuantificadas, observándose que el resto presentaba curvas de amplificación que sólo empezaban a producir señal a partir del ciclo 35 de la reacción.

Por otro lado, para los Exosomas de plasma se cuantificó la cantidad de miR-222-3p y miR-26a-5p. Estos dos miARNs presentaban según los datos de secuenciación una disminución muy similar de 4 veces en el grupo MALB. Sin embargo, en este caso el número de copias obtenido por RT-qPCR fue muy similar para ambos miARNs y no se encontraron diferencias significativas al comparar los valores de MALB vs NO MALB (Figura R23).

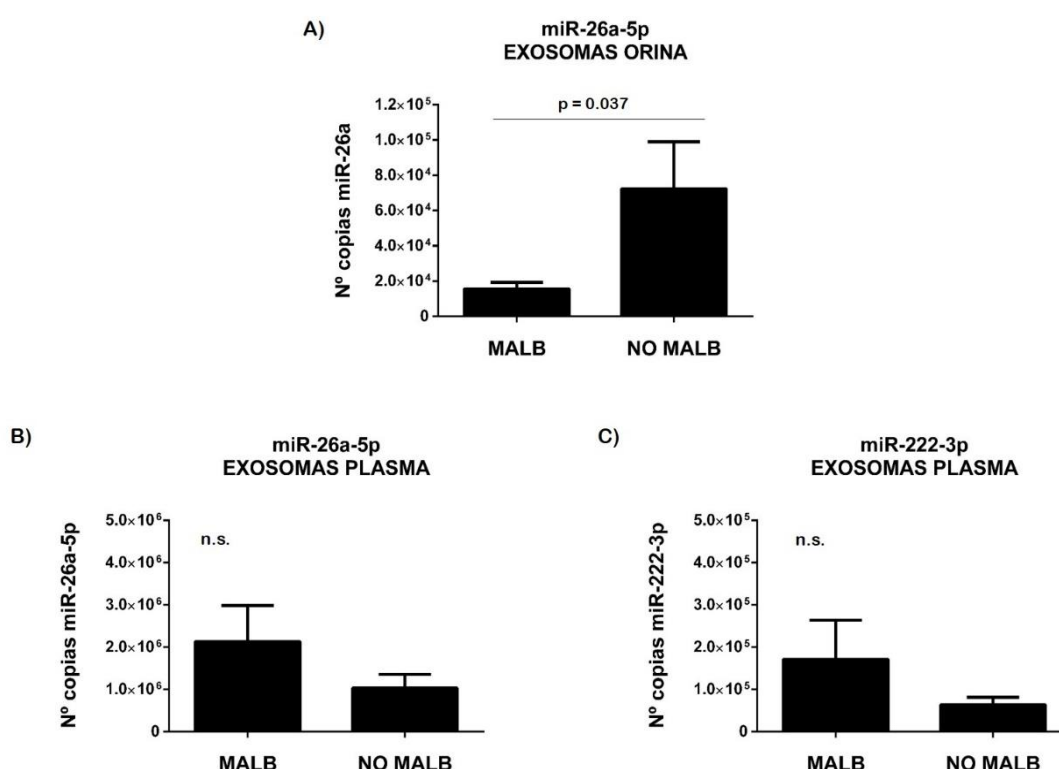


Figura R23. Cuantificación absoluta de los niveles de los miARN seleccionados en exosomas de orina y/o exosomas de plasma. Las cantidades se expresan como nº de copias totales en los pacientes hipertensos con microalbuminuria (MALB) y sin microalbuminuria (NO MALB). Los valores se muestran como media \pm error estándar de la media. n.s: no significativo; p: p valor.

7.2. Relación del número de copias de miR-26a-5p y la excreción urinaria de albumina (EUA)

Se evaluó la posible asociación entre el descenso del número de copias de miR-26a-5p en los exosomas urinarios de los pacientes microalbuminúricos con la excreción urinaria de albúmina. Primero se utilizaron conjuntamente los dos grupos de pacientes MALB y NO MALB y sus valores de EUA normalizada por creatinina. De este modo, se obtuvo una correlación inversa entre los niveles de miR-26a-5p y EUA con $r = -0,370$ ($p < 0,05$). Posteriormente, se estudió la asociación solamente dentro del grupo de pacientes microalbuminúricos (MALB), en el cuál se obtuvo una correlación inversa todavía mayor entre los niveles de miR-26a-5p y EUA ($r = -0,546$ y $p < 0,05$), tal y como se muestra en la figura R24.

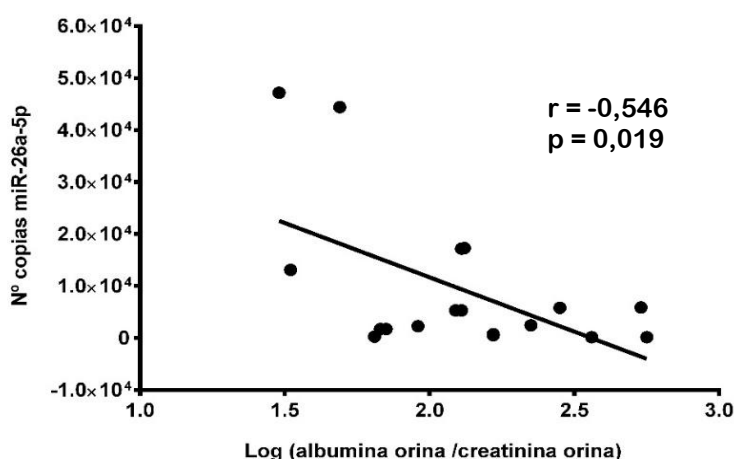


Figura R24. Correlación de la cantidad de miR-26a-5p en exosomas de orina con el logaritmo de la excreción urinaria de albumina en el grupo de pacientes microalbuminúricos (MALB).

7.3. Niveles de TGF- β y VEGF en orina

Tras al resultado obtenido en la validación, donde se apreció un descenso significativo de la cantidad de miR-26a-5p en los Exosomas de orina del grupo MALB, y su papel regulador, entre otras, de las vías de señalización del TGF- β y VEGF, se decidió comprobar si había cambios en los niveles de estas moléculas en la orina de los pacientes.

Para ello, se midieron los niveles en orina utilizando inmunoensayos tipo sándwich de doble anticuerpo. En las figuras R25 y R26 se muestran los valores de TGF- β 1 y VEGF normalizados por la cantidad de creatinina en orina. Mientras que para el primero se obtuvo un aumento significativo en el grupo MALB ($16,15 \pm 3,48$ pg/mg) frente al grupo

NO MALB ($8,97 \pm 1,32$ pg/mg), en el caso del segundo no se observaron cambios en la media de ambos grupos. Sin embargo, se observó la existencia de un subgrupo de 10 pacientes del grupo MALB que presentaba valores de VEGF claramente inferiores a la media del grupo NO MALB.

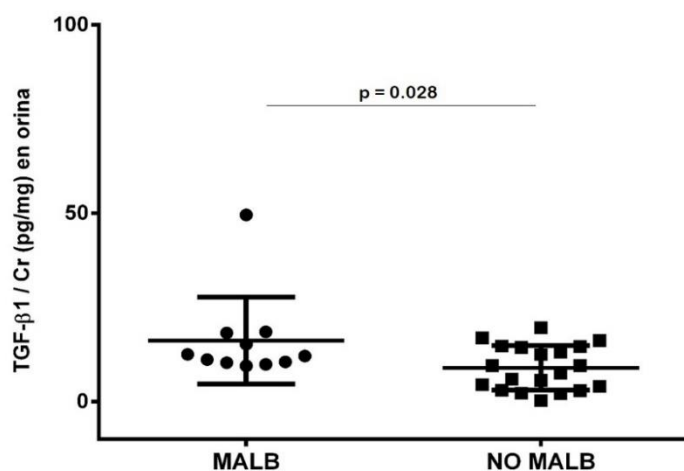


Figura R25. Aumento de la concentración de TGF-beta1 en la orina de los pacientes MALB. Los niveles de TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante beta 1) se midieron en la orina de los pacientes hipertensos con microalbuminuria (MALB) y sin microalbuminuria (NO MALB). Los valores se muestran como media \pm error estándar de la media. Cr: creatinina; p: p valor.

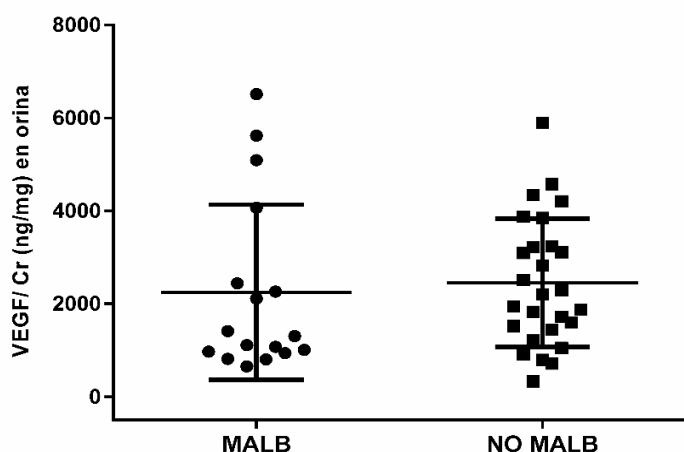


Figura R26. Valores de los niveles de VEGF en la orina de los pacientes hipertensos. Los niveles de VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) se midieron en la orina de los pacientes hipertensos con microalbuminuria (MALB) y sin microalbuminuria (NO MALB). Los valores se muestran como media \pm error estándar de la media. Cr: creatinina; p: p valor.

Los resultados obtenidos en la validación de tres miARNs del perfil asociado a la presencia de microalbuminuria en la hipertensión, muestran que solamente el descenso de los valores exosomales de miR-26a-5p dentro del grupo MALB ha podido ser confirmado por el momento mediante RT-q PCR. Además, debido a que este cambio se produjo en los exosomas urinarios y, sobre todo, a la implicación de este miARN en la regulación de TGF- β , se midieron sus niveles y se observó un aumento en la orina de los pacientes del grupo MALB. Por último, también se observó que a medida que los niveles de miR-26a-5p disminuían, se producía un aumento en la excreción urinaria de albumina.

DISCUSIÓN

La hipertensión arterial es la enfermedad crónica con mayor prevalencia, afectando a un 30-45% de la población europea y constituyendo uno de los factores de riesgo modificables más importantes para desarrollar enfermedad renal crónica. En la práctica clínica, el aumento de la excreción urinaria de albúmina (microalbuminuria) se utiliza como marcador de lesión renal y además constituye un marcador pronóstico de riesgo cardiovascular en pacientes hipertensos.

Las Vesículas Extracelulares (VE) han emergido como nuevos mediadores de la comunicación intercelular, capaces de transportar micro ARNs de forma selectiva entre células como respuesta a diferentes estímulos. En el riñón, los micro ARNs son clave en la organogénesis, participando también en el mantenimiento de la barrera de filtración. Además, en diversas enfermedades renales se han descrito cambios en el perfil de micro ARNs circulantes en plasma y orina, siendo asociados al estado patofisiológico del individuo y a la progresión de la enfermedad.

El planteamiento de esta tesis ha consistido en aportar un mayor conocimiento acerca de los mecanismos de lesión subyacentes asociados a la expresión diferencial de micro ARNs transportados por exosomas, que puedan explicar la aparición de microalbuminuria en la hipertensión, así como la búsqueda de marcadores diagnóstico y pronóstico más específicos a los utilizados hasta ahora en la práctica clínica.

Para abordar estos objetivos, por un lado se ha llevado a cabo la caracterización del daño renal incipiente de los pacientes hipertensos, utilizando nuevos marcadores de lesión glomerular asociados al estudio de los podocitos y sus componentes moleculares como nuevos biomarcadores en orina. Por otro lado, se ha realizado una aproximación novedosa al estudiar las diferencias en el perfil de micro ARNs en plasma, exosomas de plasma y exosomas de orina de pacientes hipertensos. De esta forma, este trabajo nos ha permitido obtener nueva información más específica sobre el mecanismo de lesión renal y las vías de señalización implicadas en la aparición de microalbuminuria en la hipertensión.

1. NIVELES DE ARNm Y PROTEÍNAS ASOCIADAS A PODOCITOS EN EL SEDIMENTO URINARIO DE PACIENTES HIPERTENSOS. ASOCIACIÓN CON EXCRECIÓN URINARIA DE ALBÚMINA

La importancia de la excreción urinaria de albúmina (EUA) como marcador pronóstico en la hipertensión se basa en estudios transversales que han demostrado el desarrollo de riesgo cardiovascular y daño orgánico asociado al aumento de EUA (Gerstein et al., 2001; Pascual et al., 2014). Sin embargo, la albúmina filtrada a nivel glomerular también sufre un proceso de absorción y degradación en las células del túbulo por lo que resulta complejo establecer los mecanismos predominantes que llevan a su aumento en la orina (Scott y Quaggin 2015). De ahí la importancia de identificar nuevos marcadores que permitan conocer de forma más precisa los mecanismos implicados en el desarrollo de daño renal en la hipertensión, para detener o enlentecer su progresión y disminuir su morbilidad.

El daño y pérdida de podocitos ha sido destacado como sello distintivo en la progresión de enfermedades glomerulares (Lemley et al., 2002; Wharram et al., 2005). De este modo, el daño podocitario se refleja como cambios en su estructura celular, ensanchamiento y pérdida de pedicelos, que provocan la alteración de la hendidura de filtración (Mundel et al., 2002).

En esta tesis doctoral hemos cuantificado y comparado los niveles de ARNm y proteínas asociadas a la función podocitaria en el sedimento urinario de pacientes hipertensos con y sin microalbuminuria ($EUA \geq 30$ mg/g). Además, también hemos utilizado como control positivo de daño renal un grupo de pacientes de nefropatía diabética (ND) con macroalbuminuria ($EUA \geq 300$ mg/g). Diversos estudios han mostrado divergencias en los niveles de expresión de genes asociados al podocito en esta enfermedad, aumentando los niveles de ARNm en orina pero disminuyendo en biopsias de tejido intraglomerular, evidenciando que existe una afectación podocitaria en ND (Wang et al., 2010; Baelde et al., 2007).

Nuestros resultados mostraron un descenso significativo en el grupo MALB (microalbuminúricos) de los niveles de ARNm de CD2AP, podocina y, especialmente, para nefrina (72%). En cambio, los niveles proteicos aumentaron significativamente en el grupo MALB alrededor de 2,5 veces tanto para nefrina como CD2AP y podocalixina. Aunque

solamente para nefrina se encontraron diferencias significativas al comparar los pacientes MALB con los de ND, aumentando 2 veces en este último grupo. Se pudo observar como los valores de CD2AP también aumentaban con respecto a MALB, sugiriendo una progresión en el daño podocitario a medida que aumentaba la EUA. Estas dos proteínas son elementos clave de la hendidura de filtración, interactuando entre sí y anclando el citoesqueleto de actina a la propia membrana plasmática (Perico et al., 2016). Además, se ha descrito que esta zona de unión entre podocitos es la que actuaría como sensor molecular a los cambios de presión y flujo (Möller et al., 2009). Por todo ello, los cambios observados en los niveles de nefrina y CD2AP en orina podrían ser utilizados como biomarcadores no invasivos de daño glomerular incipiente.

Por otro lado, los niveles de acuaporinas 1 y 2, marcadores de función tubular, no presentaron cambios entre los diferentes grupos, apoyando la hipótesis de que son las alteraciones glomerulares asociadas a los podocitos, las que tendrían lugar de forma inicial en los pacientes hipertensos con microalbuminuria.

Estos resultados apuntarían a que un daño incipiente en el podocito, independientemente del mecanismo de lesión, genera un cambio de fenotipo que propicia su desdiferenciación, pérdida de pedicelos y desenganche de la membrana basal, provocando un aumento de proteínas asociadas al podocito en la orina y un descenso de la actividad transcripcional reflejado en una disminución del ARNm (May et al., 2014). Este cambio ha sido propuesto como “patoadaptativo” en modelos de enfermedad renal y descrito como gradual durante la progresión del daño glomerular (Herman-Edelstein et al., 2011; Sato et al., 2009).

Además, encontramos correlaciones significativas de los niveles de proteínas de nefrina, CD2AP y podocalixina en el sedimento urinario con el aumento de EUA, mientras que los valores de ARNm de nefrina, CD2AP y podocina correlacionaron inversamente. En esta línea, un estudio previo de nuestro grupo con pacientes de nefropatía lúpica y otros autores han relacionado cambios en los valores de ARNm y proteínas asociadas a podocitos en orina con la función renal (proteinuria, FGR, EUA), obteniendo similares resultados (Wang et al., 2007; Pérez-Hernández et al., 2016).

En resumen, hemos puesto de manifiesto la utilidad de cuantificar los niveles de ARNm y proteínas asociadas al podocito en el sedimento urinario como marcadores precoces de daño glomerular en pacientes hipertensos con microalbuminuria. De especial

interés resulta la capacidad discriminativa de los niveles de nefrina y CD2AP, que podrían ser utilizados como nuevos biomarcadores en el seguimiento de la enfermedad renal y riesgo de progresión a enfermedad renal crónica.

2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES. ESTUDIO DEL ARN QUE TRANSPORTAN

Aunque no existe una técnica única para aislar VE de fluidos biológicos, el método de aislamiento utilizado en este trabajo, la ultracentrifugación diferencial, es el más extendido para separar distintas subpoblaciones de VE en diversos biofluidos (Mateescu et al., 2017; EV-Track consortium 2017).

En el caso particular del plasma, se trata de un fluido rico en complejos proteicos que pueden coprecipitar con las VE y alterar su cuantificación. La variedad de tamaño y densidad de las lipoproteínas hace que algunas sean más fácilmente separadas debido a su tamaño (HDL sobre 10 nm), mientras otras se consiguen separar mejor utilizando gradientes de densidad (VLDL similar a VE con $< 1,06 \text{ g / cm}^3$). La propia guía de expertos de la ISEV (*International Society for Extracellular Vesicles*) recomienda introducir un paso de lavado, como hemos llevado a cabo en nuestro protocolo experimental, aunque reconoce que solamente la combinación de varios métodos de aislamiento (ultracentrifugación + cromatografía de exclusión molecular) podría permitir hablar de preparaciones “puras” de un tipo de VE. Debido a ello, es más correcto hablar de fracciones enriquecidas en exosomas o microvesículas (György et al., 2011; Mateescu et al., 2017).

Un criterio básico a la hora de describir las preparaciones de VE provenientes de biofluidos es la caracterización mediante diversas aproximaciones ya que no existe una técnica “gold standard”. Así, han surgido directrices básicas y también bases de datos que utilizan la información ofrecida por los autores sobre la caracterización vesicular y aislamiento como “EV-TRACK”. Este consorcio ofrece un sistema métrico con una puntuación según la colección de técnicas utilizadas. En nuestro caso el valor obtenido se situaría en un 50%, por encima de la media de los artículos publicados que utilizan VE (Lötvall et al., 2014; EV-Track consortium 2017).

En este sentido, la presencia de poblaciones de VE de diferente tamaño en este proyecto de tesis ha sido confirmada mediante diferentes técnicas como microscopía

electrónica de transmisión y por el análisis de vesícula única mediante la tecnología TRPS (qNano). Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica presentan VE muy similares en morfología y tamaño, 58 nm en exosomas y 160 nm en microvesículas, a las descritas en la literatura (Gallo et al., 2012; Gheldof et al., 2013). Por su parte, los perfiles de tamaño obtenidos por TRPS muestran la correcta separación de ambas poblaciones de VE, microvesículas y exosomas, tanto en plasma como en orina. Aunque se observaron diferencias en el tamaño medio de VE al comparar ambas metodologías (p.ej: 58 nm en exosomas medidos por microscopía vs 110 nm en exosomas medidos por TRPS), este hecho ha sido previamente explicado por otros autores. Probablemente el propio procesamiento de las preparaciones de vesículas para su utilización en microscopía electrónica, con fases de contracción y deshidratación, provoque una disminución en el tamaño final observado (Février y Raposo 2004; Dragovic et al., 2011).

De manera complementaria, en nuestro trabajo también realizamos una caracterización proteica de las VE. Utilizamos marcadores de membrana (tetraspanina CD9) y asociados al transporte endosomal (TSG101) para poder garantizar que estábamos trabajando con fracciones enriquecidas en exosomas (Février y Raposo 2004). Encontramos la presencia de estos dos marcadores en nuestras preparaciones de VE, sobre todo en exosomas. Además, utilizamos otros marcadores como nucleoporina 62 (típica de núcleo), calnexina (típica de retículo) y GM-130 (típica del aparato de Golgi) para comprobar que no se arrastraban fragmentos u orgánulos subcelulares durante el protocolo de centrifugación diferencial (Baietti et al., 2012; Perez-Hernandez et al., 2015). De esta forma, la ausencia de marcaje en nuestras preparaciones de VE descartaba una posible contaminación durante el proceso de ultracentrifugación utilizado en este proyecto.

Por lo que respecta a la cuantificación de VE, nuestros datos obtenidos por TRPS mostraban una mayor cantidad de exosomas y microvesículas urinarias en los pacientes hipertensos. Previamente, niveles más elevados de microvesículas o micropartículas circulantes han sido relacionados con estadios clínicos en numerosas enfermedades (Nielsen et al., 2011; Amabile et al., 2014). Además, en línea con nuestros resultados, diversos autores también han cuantificado mayores niveles de VE asociados a la hipertensión (Rose et al., 2016). De manera interesante, en presencia de albuminuria se han descrito cambios en las subpoblaciones de micropartículas que correlacionan con el aumento de EUA, sugiriendo su cuantificación como marcadores precoces de daño glomerular (Huang et al., 2010; Burger et al., 2014).

No obstante, se debe tener en cuenta que solamente medimos 5 muestras de pacientes y otras 5 de controles, por lo que estos datos deben tomarse como una tendencia a confirmar en estudios futuros. Además, otra consideración importante es la ausencia de una técnica *gold standard* para cuantificar VE. Esto hace que debamos tomar con cautela los datos generados a partir de la tecnología TRPS. Al igual que los provenientes de otras técnicas como citometría de alta resolución o NTA, donde se ha demostrado que no ofrecen valores comparables entre sí, dando lugar a subestimaciones y presentando limitaciones en algunos rangos de tamaño (Maas et al., 2015).

En referencia a la calidad del ARN transportado por las VE, es complicado evaluar la integridad del ARN vesicular debido a que no suele contener ARNr. La ausencia de picos ribosomales 18S y 28S ha llevado a discutir si el perfil cualitativo representaba un enriquecimiento en la fracción de ARN pequeños (ARNp) o se trataba de artefactos provenientes de una mala extracción.

En nuestro protocolo experimental hemos utilizado los chips de electroforesis más sensibles (RNA pico chip), obteniendo perfiles enriquecidos en ARNp dentro de los exosomas urinarios, muy similares al de otros autores con muestras humanas (Cheng et al., 2014). Además, tanto los resultados de nuestra secuenciación en referencia a otros ARNp (Figura R12), como los de otros autores confirmarían un enriquecimiento de varios tipos de ARNp en exosomas y VE en general, frente a la abundancia relativa existente en la célula parental (Buck et al., 2014; van Balkom et al., 2015).

Además, para mejorar el aislamiento de exosomas en orina, nuestro protocolo también incluyó el tratamiento de VE con ditiotreitól, agente reductor que deshace las redes poliméricas de la proteína THP, muy abundante en orina. Se ha demostrado que la inclusión de este paso aumenta el rendimiento en la obtención de exosomas, liberando aquellos que quedan atrapados en las redes de THP (Fernández-Llama et al., 2010).

Otro aspecto importante a tener en cuenta al trabajar con orina es que se trata de un biofluido rico en RNAsas *per se* (Blank y Dekker 1981). Por ello, la utilidad real de incubar las preparaciones aisladas de VE urinarias con RNAsas y eliminar posibles restos de ARN libre en orina o adheridos a las VE ha sido puesto en duda (Hill et al., 2013). En estudios previos hemos llevado a cabo este tratamiento sin cambios relevantes, obteniendo además una presencia de ARN casi residual en el sobrenadante urinario libre de exosomas, hecho que confirmaría la orina como un ambiente inhóspito para la presencia de ARN libre circulante (Perez-Hernandez et al., 2015).

En el caso del plasma, es probable que el tratamiento aislado y puntual de las VE con RNasas no surta efecto. Esto se debería a la propia existencia de diferentes complejos proteicos que unen ARN en el plasma, confiriendo protección frente a la propia acción endonucleasa. Por todo ello, la ISEV acaba de actualizar sus recomendaciones sugiriendo tratamientos mixtos con proteinasa y RNasa, así como controles negativos con detergentes para asegurar que el ARN extraído se encuentra únicamente en el interior de las vesículas (Royo et al., 2013; Mateescu et al., 2017).

Por último, realizamos una serie de experimentos para confirmar la calidad e integridad del ARN vesicular, asegurando que éramos capaces de cuantificar miARNs mediante RT-qPCR, tanto en ARN extraído de exosomas como de microvesículas. Para ello se midieron los niveles de miR-335* y miR-146a, obteniendo una mayor cantidad en exosomas frente a microvesículas para ambos miARN en todos los pacientes hipertensos, independientemente de la presencia de microalbuminuria. El hecho de que nuestros pacientes presenten distintos niveles de miARNs en las diferentes subpoblaciones de VE está en consonancia con la hipótesis de que exosomas y microvesículas participan en procesos diferentes y, por tanto, existe una incorporación selectiva de miARNs y proteínas que permite a ambos tipos de VE regular funciones distintas (Villarroya-Beltri et al., 2013; Collino et al., 2017).

Al comparar los niveles de miARN exosomales en presencia de albuminuria, observamos como se producía una disminución significativa en los niveles de miR-146a solamente en los exosomas de pacientes MALB, mientras los niveles de miR-335* se mantenían muy similares en todos los pacientes. Este hecho resulta interesante ya que demostraría como la incorporación de miARNs en el interior de los exosomas sucede de manera selectiva, en función de los cambios fisiopatológicos que ocurren en el glomérulo/riñón y al proceso biológico en el que participa cada miARN. Esta hipótesis viene reforzada por otros estudios donde los cambios en los niveles de miARNs exosomales han sido asociados a enfermedades renales crónicas (Lv et al., 2013). En este sentido, estudios previos de nuestro grupo y otros trabajos han obtenido una relación de los niveles de miR-146a con proteinuria, función renal y daño endotelial glomerular (Lu et al., 2012; Huang et al., 2014; Pérez-Hernández et al., 2015).

Este estudio preliminar pone de manifiesto como la cuantificación de los miARNs en el interior de las VE, especialmente en exosomas, puede ser un punto de partida en el descubrimiento de nuevos mecanismos y rutas asociadas a la aparición y desarrollo de lesión renal en la hipertensión. De este modo, el siguiente apartado de esta tesis doctoral

se centró en la obtención de un perfil de miARNs exosomales asociado a la presencia de microalbuminuria.

3. OPTIMIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS DE ARN PEQUEÑOS PARA SECUENCIACIÓN MASIVA PROVENIENTES DE VESÍCULAS EXTRACELULARES Y PLASMA

Uno de los problemas asociados a la preparación de librerías de *small* ARN (ARNp) a partir de ARN vesicular para secuenciación masiva (NGS), radica en la baja cantidad de material genético aislado por paciente en comparación a otros materiales biológicos como células o tejidos. Además, la falta de consenso en la metodología utilizada para la extracción de ARN proveniente de VE ha supuesto una limitación técnica importante (Gracia et al., 2017). Algunos autores han intentado salvar esa dificultad agrupando muestras de ARN exosomal de pacientes con características similares, bien generando librerías y secuenciándolas a partir de *pools* de pacientes o bien llevando a cabo *microarrays* (Alvarez et al., 2012; Gildea et al., 2013; Garcia-Contreras et al., 2017). No obstante, incluso con una selección de muestras homogéneas dentro de cada grupo de pacientes, existen diferencias intragrupales en las variables clínicas y numerosos factores que pueden afectar a la cantidad de ADNc generado (estado fisiológico del paciente, aislamiento vesicular, rendimiento y calidad de la extracción de ARN, generación de la librería). De este modo, la agrupación del ARN de los pacientes puede llevar a cabo sobrerrepresentaciones de las secuencias de algunos tipos de ARN de unos pacientes frente a otros (Cutler y Jensen 2010).

En nuestro caso hemos preferido optimizar el proceso a partir de librerías individualizadas por paciente, correctamente identificadas con un índice único, conociendo así el número de lecturas específico para cada miARN de cada paciente. Esta aproximación ha sido llevada a cabo en numerosos estudios de secuenciación masiva que tenían como objetivo la búsqueda de un perfil o firma específica de miARNs asociados a enfermedad y tiene la ventaja de ofrecer datos particulares para cada paciente que pueden ser utilizados para tratamientos clínicos personalizados (Williams et al., 2013; Keller et al., 2014).

Para optimizar el proceso de la generación de librerías de ARNp individuales y maximizar el número de lecturas por paciente, se ha utilizado un kit comercial aparecido recientemente para generar librerías de ARNp, *CleanTag* de *TriLink Biotechnologies*, que utiliza adaptadores modificados químicamente, reduce la generación de dímeros inespecíficos de adaptador y permite trabajar con muy bajas cantidades de ARN inicial (<10 ng) (Shore et al., 2016). No obstante, pese a la mejora general obtenida en la generación de librerías, tras los controles de calidad hemos seguido observando una presencia residual de dímeros de adaptador. Este proceso se exacerbaba en un pequeño porcentaje de muestras con peor calidad o menor cantidad de ARN extraído y daba lugar a picos de mayor intensidad para dímero de adaptador comparado con la zona de librerías de ARNp.

Pese a las diferencias entre las muestras, se decidió tratar todas las librerías por igual y someterlas a una purificación en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Tras cortar la banda y extraer el ADNc, todas las muestras se sometieron a una reamplificación de 20 ciclos. Este último paso ha sido cuestionado en algunos estudios que utilizan NGS debido al sesgo generado y la posible sobrerrepresentación de unos fragmentos frente a otros, pudiendo alterar el perfil inicial de miARNs obtenido en cada paciente (Kozarewa et al., 2009). En el caso de la secuenciación de nuestro estudio, al tratarse de ARNp se debe tener en cuenta que el tamaño de los fragmentos generados apenas varía en 20 pb y que los miARNs presentan secuencias muy similares entre sí, por lo que el contenido en GC es casi idéntico y no debería de haber cambios en la representatividad de las secuencias (Dabney et al., 2012). Esto se pone de manifiesto en la Figura R11b de los resultados, donde se muestra una correlación de las lecturas para cada miARN encontrado y no se observa que haya habido ningún tipo de sesgo en los miARNs secuenciados a causa del proceso de reamplificación.

Al investigar como afectaba la optimización del proceso al número de secuencias correspondientes a miARN, obtuvimos un aumento de más del 60% de lecturas en el grupo de muestras purificadas. Además, el porcentaje de lecturas de miARNs frente al de lecturas totales también aumentó, obteniéndose casi el doble en el grupo purificado (31%). Nuestros resultados son concordantes con lo descrito en otros estudios que han secuenciado ARN exosomal o vesicular proveniente de orina, plasma o célula endotelial y que muestran que el 35-45% del porcentaje de las lecturas totales corresponden a miARNs (Koppers- Lalic et al., 2016; van Eijndhoven et al., 2016; Gracia et al., 2017). Al

igual que en los estudios anteriores, el resto de lecturas encontradas corresponden mayoritariamente a otros ARNp (ARN-Y) y otros ARN no codificantes (ARNInc), que se analizarán en un futuro próximo cuando se desarrollen las herramientas informáticas necesarias.

Además, se comprobó que el aumento en la profundidad de la secuenciación no alteraba la detección de los tipos de miARNs encontrados en la muestra. La correlación que obtuvimos al comparar el número de lecturas para miARNs con y sin proceso optimizado de purificación no deja lugar a dudas y sólo en la zona baja de la recta de regresión, equivalente a miARNs con < 50 lecturas, aparece una ligera dispersión de puntos. Estos resultados son muy similares a los publicados por Shore y colaboradores, donde se mostró una comparación con otros kits comerciales (“TruSeq” de Illumina y “NEBNext” de New England Biolabs) y como de los aproximadamente 800 miARNs totales secuenciados a partir de ARN cerebral, 728 eran comunes a los tres kits (Shore et al., 2016).

Por lo que respecta al posible impacto de la metodología optimizada utilizada en esta tesis doctoral en el resto de ARNp (ARN-y, ARNt, ARNsn, etc), nuestros resultados muestran como también para estas poblaciones de ARN se obtuvieron más del doble de lecturas en el grupo purificado y del mismo modo que ocurría con los miARNs, la distribución de los diferentes subtipos secuenciados no se vio alterada entre ambos procedimientos. Al igual que los resultados mostrados en nuestros análisis, el grupo del Dr. Pegtel ha publicado varios trabajos donde se muestra como en VE de plasma, la mayoría de los ARNp que no son miARNs se corresponde con Y-ARN (van Eijndhoven et al., 2016).

La implementación de este protocolo ha permitido generar librerías de ARNp a partir de muestras de ARN exosomal y plasmático de pacientes, sin alterar la distribución de los distintos tipos de ARN presentes y aumentando el número de lecturas totales disponibles.

4. PERFIL DE MICRO ARNs EXOSOMALES Y PLASMÁTICOS ASOCIADOS A LA MICROALBUMINURIA EN PACIENTES HIPERTENSOS

4.1. Características generales de la secuenciación

En los estudios que incluyen un protocolo de secuenciación masiva siempre es conveniente evaluar si la selección de individuos puede estar afectando de forma general a la distribución de lecturas por muestra y, por tanto, si podría estar introduciendo diferencias en el perfil de miARNs que no estén basadas en la presencia de la variable de estudio, que en este caso es la microalbuminuria.

En nuestro trabajo, la distribución de lecturas totales correspondientes a Plasma y Exosomas de Plasma no se vio afectada por variables como la edad o el género, ni por cuestiones de índole técnico como la *lane* del secuenciador. Sólo observamos un ligero aumento en el número de secuencias totales en el grupo MALB, con una mayor variabilidad intragrupal. Esta situación no es sorprendente ya que en la mayoría de estudios el grupo patológico suele presentar más variabilidad. Además, el aumento de miARNs circulantes en plasma ha sido generalmente justificado como una consecuencia del propio estado patofisiológico del individuo (Xu et al., 2009; Witwer 2015).

Por otro lado, también quisimos comparar el número de lecturas obtenidas para cada fracción de estudio y la posible relación con el número de miARNs diferentes secuenciados. La distribución del número de lecturas totales al comparar Plasma y Exosomas de Plasma dentro de cada grupo fue homogénea, por lo que el tipo de biofluido no afecta al número total de lecturas para miARNs obtenidas en la secuenciación. Sin embargo, sí obtuvimos valores muy diferentes en cuanto al número único de miARNs secuenciados, nuestros valores exosomales fueron inferiores, de 100 a 300 miARNs diferentes por muestra. Este hecho se encuentra en línea con lo descrito en otros trabajos que utilizan tanto la secuenciación por síntesis de Illumina como otras plataformas de NGS (184, 223 y 267 miARNs únicos) (Cheng et al., 2014; van Balkom et al., 2015; Gracia et al., 2017). Estos resultados refuerzan la idea de que los exosomas constituyen una forma de comunicación celular dirigida, conteniendo un enriquecimiento selectivo de algunos miARNs frente a otros.

4.2. Diferencias en los miARNs obtenidos según cada fracción de estudio

En este apartado se ha explorado la distribución de los miARNs diferencialmente expresados en las diferentes fracciones empleadas en el estudio. Nuestros resultados muestran que la mayoría de miARN son específicos de cada fracción, donde apenas 12 de los 146 encontrados son compartidos entre dos de las tres fracciones (plasma y exosomas de plasma) y sólo 1 de ellos inicialmente aparece en las tres (miR-let-7e-5p). Este hecho es interesante y refuerza la idea de que el protocolo experimental utilizado para separar VE de plasma y orina en esta tesis doctoral ha funcionado correctamente, generando así tres fracciones de estudio diferentes que pueden ofrecer información complementaria del estado fisiopatológico de los individuos.

Si se tiene en cuenta la naturaleza dirigida y selectiva del transporte vesicular, es esperable que los miARNs exosomales sean diferentes a los encontrados circulantes en plasma (Collino et al., 2017). Además, como se ha explicado anteriormente en el apartado 2 de la discusión, el plasma es rico en numerosos componentes que transportan miARNs de forma estable además de las VE (HDL, VLDL, Argonauta-2) (Arroyo et al., Vickers et al., 2011). Este hecho explicaría las diferencias encontradas en el perfil de miARNs plasmáticos frente a los exosomales/vesiculares en numerosas enfermedades, entre ellas la enfermedad renal crónica, donde se ha visto que los miARNs expresados diferencialmente en plasma y exosomas de plasma son diferentes y además participan regulando funciones biológicas distintas (Xie et al., 2017).

Por lo que respecta a la fracción de Exosomas de orina, 6 miARNs fueron encontrados diferencialmente expresados en presencia de microalbuminuria (miR-143-3p, miR-92b-3p, miR-146a-5p, miR-934, miR-7706), uno de ellos compartido con la fracción de Exosomas de plasma (miR-26a-5p). Estudios similares a los nuestros que han utilizado exosomas urinarios, han descrito una desregulación en los niveles de miARNs en nefropatía diabética asociada a diabetes tipo I y II (22 y 16 miARNs, respectivamente) (Barutta et al., 2013; Delic et al., 2016). Aunque el número de miARNs diferencialmente expresados es superior al encontrado en nuestro trabajo, en estos estudios los pacientes eran diabéticos y presentaban microalbuminuria pero no todos eran hipertensos ni tampoco se realizaron estudios de secuenciación masiva para cuantificar los miARNs. También se ha demostrado recientemente que las diferentes poblaciones de exosomas liberadas al espacio urinario interaccionan en otras partes de la nefrona y son internalizadas por diversos tipos de células tubulares (Gracia et al., 2017). De este modo,

este proceso fisiológico de captación/liberación de exosomas a lo largo de la nefrona podría estar enmascarando de alguna manera la composición de miARN exosomal liberada por las células glomerulares en la orina primaria, sobre todo si tenemos en cuenta que el daño renal de nuestra población es muy incipiente.

Por último, para intentar ajustar lo máximo posible las diferencias encontradas en el perfil de miARNs a la presencia de microalbuminuria se llevaron a cabo comparaciones múltiples entre las fracciones estudiadas (Plasma, Exosomas de plasma y Exosomas de orina). El objetivo era encontrar aquellos miARNs que apareciesen diferencialmente expresados al comparar dos fracciones en ambos grupos de pacientes por separado y, posteriormente, comprobar si se encontraban en el listado inicial obtenido. Varios de los miARNs encontrados en estas comparativas corresponden a la familia “let-7”, descritos en numerosos procesos fisiológicos e incluso propuestos como *housekeeping* para normalizar la expresión en la validación de marcadores en suero y plasma (Shell et al., 2007; Bao et al., 2013; Chen et al., 2013). Una vez eliminados los miARNs que aparecían en las comparaciones múltiples y centrarnos en aquellos miARNs que sufrieran un importante cambio, utilizando $\log_2(\text{FC}) \geq 2$ o ≤ -2 al igual que otros autores habían hecho (Munari et al., 2014; Lee et al., 2016), el listado inicial de 136 miARNs se redujo a un total de 73 miARNs seleccionados, de los cuales 53 (72%) se encontraban infraexpresados en el grupo MALB ($\log_2(\text{FC}) \leq -2$) y 20 (28%) sobreexpresados ($\log_2(\text{FC}) \geq 2$).

No existen trabajos que hayan abordado el estudio del perfil de miARNs asociado a la microalbuminuria a partir de plasma, exosomas de plasma y orina de manera conjunta, pero si se ha descrito un descenso general en los niveles de miARNs circulantes a medida que avanza la enfermedad renal, lo cuál podría explicar porque la mayoría de los miARNs diferencialmente expresados aparecen *down-regulated* en el grupo MALB (Neal et al., 2011). Por otro lado, al utilizar este punto de corte ($\log_2(\text{FC}) \geq 2$ o ≤ -2) el 75% de los 73 miARNs diferencialmente expresados utilizados en los análisis de enriquecimiento y sobrerrepresentación se encontraban transportados por Exosomas de Plasma. Un resultado parecido ha sido descrito en modelos de enfermedad renal, donde se ha mostrado que la intensidad del cambio en los exosomas fue muy superior a la del plasma, donde apenas un 5% de los miARNs diferencialmente expresados obtenidos eran significativos y presentaban a su vez un $\text{FC} \geq 2$ (Xie et al., 2017).

4.3. Procesos biológicos regulados por el perfil de micro ARNs asociados a la presencia de microalbuminuria: implicación biológica de los resultados

La selección de miARNs (n=73) fue sometida a un análisis de sobrerrepresentación (Over-Expressed Analysis) y de enriquecimiento de miARN (Gene Set Enrichment Analysis). Un total de 25 procesos o funciones biológicas de la base de datos de KEGG estaban regulados por el perfil de miARNs diferencialmente expresado en la albuminuria. A continuación, pasamos a describir la implicación biológica de aquellos procesos regulados por un mayor número de miARNs del perfil asociado a la microalbuminuria (Ranking, Tabla R6).

4.3.1. Regulación del citoesqueleto de Actina

Nuestros resultados mostraron la regulación del citoesqueleto de actina como el proceso más ampliamente modulado, con un 76% de miARNs del perfil participando en genes implicados en esta ruta. Este resultado estaría apoyado por la desdiferenciación demostrada en los podocitos excretados en la orina de los pacientes con MALB, que presentaban cambios en los niveles proteicos y de expresión génica de genes asociados al podocito, reflejado en el apartado 2 de los resultados. Como hemos visto, el mantenimiento de los procesos podocitarios o pedicelos que recubren los capilares y forman la hendidura de filtración es clave para una correcta filtración glomerular (Soda et al., 2012). Esta morfología tan especializada requiere de la formación de fibras de actina, que son reguladas de una forma dinámica y rápida para adaptarse a los cambios y poder mantener la arquitectura única presentada por este tipo celular (Mundel et al., 1997; Perico et al., 2016). Por lo que, mutaciones en genes asociados a la reorganización de actina han sido descritas en formas hereditarias de síndrome nefrótico y glomeruloesclerosis focal y segmentaria (FSGS, en inglés) (Kaplan et al., 2000; Brown et al., 2010). Una de las familias de proteínas que interactúan con la actina de forma crítica son las GTPasas pequeñas como RhoA, Rac1 y Cdc42. Su incorrecta activación ha sido descrita como el desencadenante de daño glomerular en numerosos modelos animales y FSGS, generando ensanchamiento de pedicelos (*effacement*) y proteinuria (Robins et al., 2017). Además, la acción de actina en colaboración con GTPasas de gran tamaño como dinamina 1 y 2 ha sido descrita como un regulador crítico de la permselectividad renal (Waters et al., 2012). Modelos murinos con mutaciones en los genes dinamina 1 y 2 han

desarrollado proteinuria y fallo renal, con glomérulos mostrando pérdida y ensanchamiento de pedicelos (Soda et al., 2012).

También se ha destacado el papel de la actina en la endocitosis, clave en el reciclado y transporte de proteínas de membrana para mantener la polaridad celular y la hendidura de filtración (Welsch et al., 2005; Soda et al., 2012). Relacionado con este proceso, en un reciente estudio Schießl y colaboradores demostraron la existencia de endocitosis y transcitosis de albúmina en podocitos de rata. Este mecanismo sería responsable del 10% de la filtración de albúmina, cargada en vesículas desde la zona basal de los capilares glomerulares y liberada en la zona apical del podocito en contacto con el espacio urinario. Observaron como la acumulación de albúmina en la membrana basal y la presencia de Angiotensina II aumentaba este tipo de transporte, generando estrés podocitario y pudiendo dar lugar a una respuesta inflamatoria y apoptosis (Okamura et al., 2013; Schiessl et al., 2016). En esta misma línea, otros autores también han propuesto un papel tóxico a la acumulación de albúmina en las vesículas acidificadas, potenciando la inhibición del lisosoma (Carson et al., 2014).

Como hemos visto, la regulación de actina podría estar modificando numerosas funciones podocitarias, no solo a nivel de la propia arquitectura celular sino participando en otros procesos biológicos como la endocitosis y el transporte activo de proteínas. Estas dos vías junto al lisosoma también aparecen en nuestra red de interacciones, aunque no están entre los procesos más regulados por el perfil de miARNs.

4.3.2. Regulación de la vía de señalización de Calcio

Otra ruta regulada por más de la mitad del perfil de miARNs (16 en total) es la vía de señalización de calcio (Ca). El papel del Ca en la motilidad celular ha sido ampliamente estudiado en células musculares (Clapham 2007). En los podocitos, su rol ha sido especialmente descrito debido a la presencia de canales de Ca en la hendidura de filtración, que regulan tanto cambios en el propio citoesqueleto de actina como la expresión de proteínas que interactúan con este (Greka y Mundel 2012b). El canal más abundante de la hendidura es TRPC6, que permite a los podocitos sentir los cambios que ocurren en el microambiente glomerular como alteraciones en la presión y cambios en el flujo fluídico (Reiser et al., 2005; Dryer y Reiser 2010). Se han descrito alteraciones genéticas en pacientes de FSGS, muchas de ellas con ganancia de función que aumentan los niveles de Ca intracelular, disminuyendo la expresión de proteínas clave como nefrina o

sinaptopodina y estimulando la actividad de otras como RhoA, contribuyendo así a la disfunción del podocito e incluso a su apoptosis (Jiang et al., 2011; Riehle et al., 2016). Cómo la sobreexpresión de TRPC6 afecta a los podocitos también ha sido demostrada recientemente en un modelo de rata con nefropatía inducida por adriamicina y TGF- β 1 (del inglés, Transforming Growth Factor β). Huang y colaboradores han demostrado que TRCP6 aumenta la expresión de desmina (que conecta el citoesqueleto con la matriz extracelular) y caspasa-9, que induce apoptosis, pudiendo ser parcialmente revertido el proceso *in vitro* cuando se bloqueaba la expresión de TRCP6 (Huang et al., 2017).

4.3.3. *Regulación de la matriz extracelular, moléculas de adhesión celular, uniones estrechas, adherentes y focales*

Nuestros resultados también indicaron como el bloque de procesos biológicos que controlan la adhesión e interacción celular con la matriz extracelular aparece modulado por casi un tercio de los miARNs exosomales de la red de interacciones (8 en total).

La Matriz Extracelular (MEC) es una red tridimensional y dinámica compuesta por grandes macromoléculas secretadas (glicoproteínas, colágenos, proteoglicanos y glicosaminoglicanos) que constituyen el andamiaje estructural que permite la adhesión y migración celular (Kim et al., 2011). Esta “malla” no sólo ejerce de soporte estructural sino que interacciona con las células del microambiente y modula la señalización celular controlando el paso de moléculas como factores de transcripción y citoquinas (Hynes et al., 2009).

En el glomérulo, las MEC de podocitos, células endoteliales glomerulares (CEg) y mesangiales se organizan formando la membrana glomerular basal. Esta circunstancia hace que esta membrana especializada presente un mayor grosor (300-350 nm en humanos) que la mayoría de MEC que se encuentran en otros órganos, formando un nicho complejo en el que se han identificado hasta 144 proteínas estructurales y reguladoras (Byron et al., 2014). Para poder adherirse a la MEC, podocitos y CEg utilizan diferentes integrinas que actúan como anclaje inicial y participan en el reclutamiento de otras proteínas que actúan a su vez como adaptadores y efectores (Lennon et al., 2014). Estos puntos de unión a la MEC se conocen como “adhesiones focales” y la desregulación o mutación de sus componentes ha sido descrita como causante de pérdida de pedicelos, proteinuria y daño renal en síndrome nefrótico y glomeruloesclerosis (Nicolau et al., 2012). Además, un gran número de proteínas reclutadas por las integrinas conectan a estas con

los podocitos, llevando a cabo la transducción de señales (factores de crecimiento y transcripción, citoquinas) desde la MEC hasta el citoesqueleto de actina: Talina, Vinculina, pequeñas GTPasas como RhoA, FAK (activado cuando aparece daño glomerular) (Ma et al., 2010). Otros adaptadores como ILK (del inglés, *integrin-linked kinase*) interactúan con nefrina en la hendidura de filtración y su silenciamiento específico en podocitos genera daños tanto en la membrana glomerular basal como en las uniones podocitarias (El-Aouni et al., 2006).

Como ya hemos descrito en el apartado 1 de la discusión, la hendidura de filtración supone una unión célula-célula particular que contiene tanto proteínas únicas, como otras típicas de uniones adherentes y de uniones estrechas (Lennon et al., 2014). De este modo, alteraciones en proteínas como NepH-1, nefrina, CD2AP o podocina, provocan cambios en la integridad de la barrera de filtración (Shih et al., 1999). Nuestros resultados están en concordancia, ya que se observa como una disminución de la expresión de estos genes aparece solo en pacientes hipertensos con microalbuminuria. Sin embargo, el complejo proteico con el que interactúan las proteínas presentes en la hendidura de filtración y en las uniones con otros podocitos es mucho más amplio. Estudios ontológicos con redes de interacción proteína-proteína han demostrado que existe un enriquecimiento de varios procesos biológicos con los que interactúan las proteínas de la hendidura. De manera interesante, prácticamente todos estos procesos son comunes a los procesos regulados por nuestro perfil de miARNs exosomales: señalización de calcio, vía de señalización de MAPK, organización del citoesqueleto de actina, endocitosis, tirosin-fosforilación y uniones SH2/SH3 (Lennon et al., 2014).

4.3.4. Regulación de la vía de señalización de TGF- β

La vía de señalización de esta citoquina aparece regulada por más del 50% de los miARNs de la red de interacción asociada a la presencia de microalbuminuria. Este factor de crecimiento es un regulador multifuncional que modula numerosos procesos como la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, adhesión y migración de algunos tipos celulares y la producción de proteínas que forman parte de la MEC (Dennler et al., 2002). A niveles fisiológicos se ha establecido que presenta capacidad inmunoreguladora, participa en la reparación de tejidos y mantenimiento de funciones orgánicas, sin embargo, la sobreexpresión de TGF- β aparece ligada a numerosas alteraciones en enfermedades renales, tanto a nivel glomerular como tubular (López-Hernández et al., 2012). En este

trabajo hemos demostrado que los niveles de TGF- β 1 aumentan significativamente en la orina de los pacientes microalbuminúricos. Una vez unido a su receptor, TGF- β participa en diversas funciones biológicas mediante la transducción de la señal, fosforilando a factores de transcripción como Smad y también activando otras cascadas de señalización como MAPK (Ras, Raf, Erk, JNK), vía de señalización que aparece también modulada por hasta 15 miARNs del perfil de miARNs que hemos obtenido, y también GTPasas reguladoras de citoesqueleto de actina como las comentadas anteriormente (RhoA, Rac1, Cdc42) (Derynck and Zhang 2003).

Si nos centramos en los efectos descritos en el glomérulo asociados al aumento de TGF- β , encontramos ejemplos que muestran como afecta a todas las células que lo componen. En podocitos se ha observado que TGF- β es un potente mediador en la formación y mantenimiento de la MEC, no sólo por la secreción de componentes *per se* sino también por la producción de metaloproteinasas que participan en su remodelación (Gruden et al., 2005; Wolf et al., 2005). Un aumento de TGF- β en ratas nefróticas ha sido relacionado con la pérdida de anclaje a la MEC mediante la disminución de la integrina α 3 β 1, hecho también observado en podocitos de pacientes de FSGS (Wolf et al., 2005; Lee et al., 2012). En Nefropatía Diabética (ND), se ha visto que TGF- β promueve la sobreexpresión de varios tipos de colágeno, contribuyendo a aumentar la densidad y espesor de la membrana glomerular basal y, en otro estudio, como disminuye la expresión de nefrina, contribuyendo al ensanchamiento de los pedicelos (Iglesias de la Cruz et al., 2002; Gruden et al., 2005). Además, trabajos anteriores han descrito el aumento de la apoptosis podocitaria asociada a TGF- β en el transcurso de enfermedades glomerulares y podocitopatías (Schiffer et al., 2001; Lee et al., 2010). Incluso se ha llegado a demostrar la activación de TGF- β como respuesta a la sobrecarga de albúmina en podocitos de rata, produciendo la desorganización del citoesqueleto de actina y posterior apoptosis (Yoshida et al., 2008). Cabe destacar que este proceso biológico junto con la ruta de señalización de p53 aparece regulada por 14 de los 29 miARNs de nuestro perfil asociado a la microalbuminuria.

No obstante, se ha puesto en duda la aparición temprana de apoptosis en los podocitos ligada a la microalbuminuria. Así, se ha propuesto la existencia de un proceso reversible que podría ser la transición epitelio-mesenquimal (Li et al., 2008). Sin embargo, otros autores prefieren el término de “transformación del podocito asociada a enfermedad” (May et al., 2014). En esta tesis hemos demostrado que los podocitos liberados en la orina

de pacientes hipertensos con microalbuminuria sufren un proceso de desdiferenciación, con cambios específicos en el fenotipo molecular asociado a los niveles de ARNm y proteínas. Creemos que nuestros resultados reforzarían la hipótesis de que “cambios patoadaptativos” se están produciendo en los podocitos como respuesta al aumento en los niveles de TGF- β en el microambiente glomerular de los pacientes microalbuminuricos.

4.3.5. Regulación de la vía de señalización de VEGF

En los últimos años se ha comenzado a describir la existencia de comunicación intercelular en el glomérulo, proceso clave para el desarrollo y mantenimiento de la barrera de filtración glomerular. Podocitos, CEg, células mesangiales y parietales secretan al microambiente glomerular numerosas moléculas como factores de crecimiento (VEGF, ANGPT, EGF, PDGF, IGF), óxido nítrico, citoquinas y quimiocinas (Bartlett et al., 2016).

Especialmente relevantes han sido los experimentos del grupo de Susan Quaggin, que inicialmente demostraron que VEGF-A era producido mayoritariamente por los podocitos y su presencia era necesaria para la formación y mantenimiento de la barrera de filtración glomerular. Posteriormente en 2010, demostraron que el cambio en la expresión de VEGF por parte de los podocitos afectaba en exclusiva a las CEg, provocando defectos en la microvasculatura glomerular, en uno de los primeros ejemplos de señalización paracrina en el glomérulo (Eremina et al., 2003; Sison et al., 2010). En nuestra red de interacción miARN – procesos biológicos de KEGG, alrededor de un 30% de los miARNs actúan sobre esta vía de señalización.

Aunque en nuestros pacientes los niveles de VEGF en orina no presentaron cambios entre los grupos de estudio, sí que se observó un subgrupo de pacientes dentro del grupo MALB con valores claramente inferiores a la media del grupo de pacientes hipertensos normoalbuminuricos (casi la mitad). Este descenso en nuestros pacientes sería patológico, ya que se le ha otorgado un papel protector a VEGF-A contra la apoptosis en las paredes de los vasos sanguíneos (Oltean et al., 2015). En esta línea, también ha sido descrito un descenso en los niveles de VEGF-A glomerulares a medida que progresa la ND en humanos y, cómo existe una correlación entre el descenso en los niveles de ARNm de marcadores podocitarios (nefrina, podocina, WT1), su disminución en número y un descenso en VEGF-A (Baelde et al., 2007). Quizás una cohorte mayor de pacientes podría ayudarnos a esclarecer si hay cambios en los niveles medios urinarios de VEGF. Como hemos visto, diversos trabajos han demostrado que el endotelio fenestrado

glomerular necesita una producción estable de VEGF por parte de los podocitos. Así, el proceso de desdiferenciación que se está produciendo en los podocitos encontrados en el sedimento urinario de nuestros pacientes microalbuminuricos, no sólo podría estar afectando a su morfología y función, sino que podría estar provocando una disminución en los niveles glomerulares de VEGF, afectando a la homeostasis de las CEG y, por tanto, a la permeabilidad de la membrana glomerular basal a agua y albúmina (Satchell et al., 2004; Foster et al., 2008; Satchell 2013).

Finalmente, hemos demostrado como el perfil de micro ARNs exosomales diferencialmente expresado asociado a la microalbuminuria establecido en esta tesis doctoral, participa principalmente en la regulación de muchos de los mecanismos fisiopatológicos que pueden desencadenar el inicio y la progresión del daño glomerular, afectando directamente a podocitos, célula endotelial glomerular y células mesangiales. De este modo, los miARNs exosomales constituirían una parte importante de los mediadores que están actuando en el *crosstalk* intraglomerular, siendo responsables del mantenimiento de la homeostasis interna y el funcionamiento de la barrera de filtración.

5. VALIDACIÓN MICRO ARNs EXOSOMALES. RELACIÓN DE miR-26a-5p CON TGF- β Y ALBUMINURIA

Del perfil final de 29 miARNs diferencialmente expresados al comparar los grupos MALB vs NO MALB, se siguieron tanto criterios biológicos como metodológicos, que vienen explicados en detalle en el apartado 9.1 de la metodología, para la selección de los miARNs a validar. De esta manera, se seleccionaron miR-143-3p, miR-222-3p y miR-26a-5p.

En el caso de miR-143-3p (miR-143), una de las razones clave para su elección fue que se trataba del único miARN que aparecía diferencialmente expresado en el perfil específicamente en Exosomas de Orina. Este tipo particular de exosomas han suscitado mucho interés debido a que permiten el acceso a información, teóricamente, más directa de todas las células que componen el sistema renal, siendo las poblaciones exosomales urinarias una fuente de información del estado patofisiológico del individuo (van Balkom et al., 2011; Fang et al., 2013). Por otro lado, ha sido descrita la influencia de TGF- β sobre este miARN y el reciente trabajo del grupo del Dr. Schiffer demostró como la

sobreexpresión de miR-143 por parte de los podocitos provocaba la degradación de varios proteoglicanos tanto en el glicocáliz de CEG como de los propios, provocando la desorganización de la membrana glomerular basal y proteinuria (Long y Miano 2011; Mueller-Deile et al., 2016). Lamentablemente, la mayoría de las muestras presentaron valores muy altos de Ct para miR-143 y no fue factible poder comparar los valores de un grupo frente al otro.

Por lo que respecta a la validación de miR-222-3p (miR-222), esta se llevó a cabo en Exosomas de Plasma para intentar confirmar los resultados obtenidos en el perfil. La transferencia funcional de este miARN vía VE ha sido demostrada en varios trabajos, produciendo un efecto protector para células mesangiales y endoteliales en ambientes hiperglicémicos (Jansen et al., 2015; Gallo et al., 2016). Además, se le ha otorgado un rol importante en el remodelado vascular asociado a inflamación, proceso que también se da en la vasculatura renal en la propia hipertensión (Edgley et al., 2003; Dentelli et al., 2010). Los resultados de la validación fueron muy similares en ambos grupos de pacientes y no pudieron confirmar las diferencias obtenidas por secuenciación masiva para los niveles de miR-222 en Exosomas de Plasma.

Finalmente, sí se pudieron confirmar los resultados obtenidos para miR-26a-5p (miR-26a) en la fracción de Exosomas de Orina, cuantificándose un descenso significativo en el grupo de pacientes hipertensos con microalbuminuria. De ahí que profundizáramos más en su posible asociación con un parámetro clínico establecido como la excreción urinaria de albúmina y en la participación de este miARN regulando procesos relacionados con la aparición de daño glomerular.

5.1. Descenso en los niveles de miR-26a-5p en exosomas urinarios de pacientes con microalbuminuria. Relación con TGF- β y la excreción urinaria de albúmina (EUA)

MiR-26a apareció en el perfil de miARNs final regulando diversas vías de señalización (TGF- β , VEGF, señalización de calcio, MAPK) con implicaciones biológicas importantes en las células glomerulares. Este miARN ha sido descrito como un elemento indispensable para la formación inicial del glomérulo, así como en el mantenimiento de la barrera de filtración glomerular (Ho et al., 2008). En este sentido, varios estudios han descrito un patrón de expresión exclusivamente podocitario/glomerular, aunque en otros casos también se ha caracterizado su expresión en diversas zonas del túbulo (Ho et al., 2008; Ichii et al., 2014; Koga et al., 2015).

Otros autores han demostrado que miR-26a participa en otros tipos celulares regulando procesos biológicos relacionados con nuestros resultados. Por un lado, se ha descrito la importancia de miR-26a como mediador en la diferenciación del músculo liso y esquelético, tipos celulares con una organización del citoesqueleto muy particular (Mohamed et al., 2011; Dey et al., 2012). También ha sido propuesto como “interruptor angiogénico” tanto a nivel fisiológico como patológico en las células endoteliales, bloqueando a Smad1 e inhibiendo el ciclo celular (Icli et al., 2013). Por otro lado, se ha descrito que altos niveles de glucosa estimulan la expresión de miR-26a, promoviendo este último un aumento en la hipertrofia mesangial junto a una mayor producción de fibronectina y colágeno I (Dey et al., 2012). Complementariamente, se ha visto que esas mismas condiciones disminuyen la cantidad de miR-26a liberada en micropartículas endoteliales, relacionándose estos niveles con un mayor riesgo de enfermedad coronaria (Jansen et al., 2016).

En nuestra validación por RT-qPCR hemos cuantificado niveles muy similares en la fracción de Exosomas de Plasma, sin embargo, sí se obtuvo un descenso significativo en el número de copias para miR-26a en los Exosomas de Orina de pacientes con microalbuminuria. Este descenso en los niveles de miR-26a de más de 4 veces, mostró una correlación inversa con la excreción urinaria de albúmina ($r=-0,546$ y $p<0,05$). En la misma línea, un descenso en los niveles de miR-26a ha sido relacionado en la literatura con funciones renales tales como FGR y excreción urinaria de albúmina. Estas asociaciones han sido descritas tanto en biopsias renales como en modelos de ND (Ichii et al., 2014; Koga et al., 2015; Zheng et al., 2016). Complementariamente, otros autores han demostrado que miR-26a es transportado por exosomas urinarios en pacientes sanos, siendo además uno de los 10 miARNs más abundantes en este tipo de vesículas (Gracia et al., 2017; Cheng et al., 2014). Este hecho reforzaría el papel de miR-26a como un elemento clave en la regulación de la homeostasis renal.

Además, nuestros resultados también mostraron valores de TGF- β 1 más elevados en orina de pacientes hipertensos microalbuminuricos. Como hemos visto en el apartado 4.3.4., las implicaciones del aumento de TGF- β en el glomérulo y su papel en la aparición y progresión de enfermedades renales ha sido ampliamente descrita (Loeffler y Wolf 2014). En cuanto a su relación con miR-26a, diversos estudios han demostrado que el aumento de TGF- β suprime la expresión de miR-26a en podocitos y células epiteliales renales, aumentando la expresión de proteínas de la matriz extracelular. El mecanismo de

acción incluye al factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) como diana de miR-26a, que al estar reprimido por acción de TGF- β , estimularía la producción de diversos tipos de colágeno, engrosamiento y densidad de la matriz extracelular (Koga et al., 2015; Zheng et al., 2016). Además, CTGF ha sido utilizado como diana terapéutica en enfermedades renales, observándose un descenso en el grosor de la membrana glomerular basal, albuminuria y también aumento de la hipertrofia en células mesangiales (Guha et al., 2007; Nguyen et al., 2008).

Especialmente interesante resulta el trabajo de Zheng y colaboradores con miR-26a y miR-30c, donde han establecido su papel en la regulación de la transición epitelio-mesenquimal inducida por TGF- β (Zheng et al., 2016). Inicialmente, mostraron como en células del túbulo renal incubadas con TGF- β se producía un descenso en los niveles de miR-26a y miR-30c. También demostraron que estos miARN bloqueaban la síntesis del factor CTGF en las células del túbulo vía disminución de la señalización MAPK y que esto suponía una mejora en el mantenimiento del fenotipo epitelial. Finalmente, también encontraron un descenso de estos dos miARNs en la zona cortical del riñón de un modelo de rata diabética, junto a un aumento de fibrosis tubulointersticial y depósitos de colágeno tipo I. Resulta muy interesante la hipótesis de ambos miARNs actuando cooperativamente para atenuar la transición epitelio-mesenquimal en distintas zonas de la nefrona. No obstante, a diferencia de nuestra población de estudio, los pacientes del estudio de Zheng presentaban nefropatía diabética y valores mucho más altos de albúmina. Este hecho podría explicar porque miR-30c no aparece diferencialmente expresado en nuestro perfil de miARNs exosomales asociado a microalbuminuria. Además, debemos tener en cuenta que miR-30c presenta un patrón de expresión mayoritariamente tubular y ha sido descrito también otros estudios afectando a esa zona específica de la nefrona (Ho et al., 2008; Zhao et al., 2017).

Finalmente si tomamos el ejemplo de miR-30c, podemos encontrar en la literatura científica numerosos microARNs (miR-184, miR-21, miR-451, miR-16, miR-130b, miR-144, miR-29c) que tampoco aparecen en nuestro perfil asociado a la microalbuminuria, pero que sin embargo, han sido descritos como actores principales en mecanismos de lesión asociados a células del túbulo renal (Lv et al., 2013; Bai et al., 2016; Liu et al., 2016; Mohan et al., 2016; Zhou et al., 2016; Kölling et al., 2017; Zanchi et al., 2017; Zhao et al., 2017). Este hecho, junto a las funciones biológicas que están siendo reguladas por los miARNs diferencialmente expresados de nuestro perfil, nos lleva a concluir que las

alteraciones de los miARNs exosomales serían indicadores del mecanismo de lesión subyacente que está provocando daño glomerular en los pacientes hipertensos con microalbuminuria.

Pensamos que de entre los 29 miARNs de nuestro perfil asociado a microalbuminuria, miR-26a es el que tiene especial interés. El hecho de que participe en la regulación de vías clave en el desarrollo y mantenimiento de la barrera de filtración glomerular, que sea transportado tanto por exosomas de plasma como urinarios y su relación con los niveles de EUA en los pacientes, hacen de este miARN exosomal un firme candidato para futuros estudios funcionales a la vez que se evalúa su posible papel como biomarcador diagnóstico y pronóstico en la aparición y desarrollo de microalbuminuria en la hipertensión arterial.

6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La principal limitación de esta tesis doctoral es el número de pacientes empleado. Sin embargo, cabe destacar que se ha llevado a cabo una aproximación novedosa utilizando ARN circulante proveniente de tres fracciones por cada paciente (plasma, exosomas de plasma y exosomas de orina), por lo que su valor en conjunto ha permitido acceder a nuevas implicaciones biológicas relacionadas con la aparición de daño renal en la hipertensión. Pasos futuros para el establecimiento de un perfil o panel de biomarcadores requerirán la validación de nuestros resultados en cohortes multicéntricas e independientes.

También hay que ser especialmente cautelosos en un campo novedoso como el de las VE, ya que aún faltan procedimientos estandarizados que permitan hacer comparables los estudios, por ejemplo a nivel de biofluido empleado, o a la propia técnica de aislamiento de VE, haciendo de este modo que la información sea extrapolable de un estudio a otro.

Por otro lado, en los estudios de validación de miARNs es sabido que la sensibilidad y la eficiencia entre técnicas como la secuenciación masiva (NGS) y RT-qPCR no es comparable, hecho que parece exacerbarse en muestras de orina (Nassirpour et al., 2014; Blondal et al., 2017). Además de las diferencias técnicas, se llevó a cabo una normalización por volumen de ARN eluido, partiendo del mismo volumen inicial de

biofluido para aislar las fracciones exosomales. Este tipo de aproximación se ha utilizado para reducir variaciones técnicas ante la falta de controles internos (*housekeeping*) en los estudios de miARN circulantes (van Eijndhoven et al., 2016; Freedman et al., 2016), hecho que también se da en los estudios de cuantificación de miARN exosomales/vesiculares por RT-qPCR (Li et al., 2015; Garcia-Contreras et al., 2017). Por ello, algunos autores han propuesto *housekeeping* “caseros” que no varían en presencia de la enfermedad a estudio o que funcionan bien para las VE obtenidas a partir de un tipo celular concreto (Garcia-Contreras et al., 2017). Es posible que aplicando esta aproximación fuéramos capaces de obtener diferencias significativas para miR-222 y miR-26a en la fracción de Exosomas de Plasma tal y como han hecho otros autores (Garcia-Contreras).

Además, la gran cantidad de datos generados en los estudios de secuenciación masiva hacen necesaria la aplicación de filtros que nos ayuden a manejar y procesar la información. Aún combinando diferentes estrategias de análisis complementarias, es necesario establecer puntos de corte ($\log FC > 2$ o < -2) y diferentes filtros que podrían dejar fuera de la red de interacciones a algunos miARN relevantes.

Por último, el desarrollo de experimentos funcionales es clave para poder describir el mecanismo de acción patofisiológico concreto de los miARNs que forman parte del perfil asociado a la presencia de microalbuminuria en la hipertensión. De esta forma, se puede determinar su funcionalidad biológica y conocer mejor su papel particular en la aparición o desarrollo de la enfermedad, dando lugar a posibles nuevas dianas terapéuticas.

7. INNOVACIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabajo representa un estudio novedoso al evidenciar cómo las VE suponen una fuente de información útil en la búsqueda de nuevos marcadores diagnóstico y pronóstico más específicos, pudiendo ser utilizadas en el manejo clínico de la hipertensión y la microalbuminuria.

Uno de los puntos a favor de la incorporación y uso de las VE en la práctica clínica es su carácter no invasivo. En este aspecto, el estudio de los miARNs vesiculares/exosomales supone además una evolución del concepto clásico de “biopsia líquida”, que se ha estado desarrollando durante los últimos 10-15 años y cuyas

expectativas clínicas no se han cumplido todavía para numerosas enfermedades (Witwer 2015). No obstante, la estandarización en el uso de protocolos será clave para extender su uso en la práctica hospitalaria como marcadores. En este sentido, la industria biotecnológica está desarrollando nuevos kits que permiten acelerar el proceso de aislamiento y obtención del cargo transportado con el fin de proporcionar datos robustos y fiables de aplicación más directa y sencilla.

Otro de los aspectos más prometedores en el presente y futuro de las VE es su utilización como elementos terapéuticos. Varias aproximaciones se están llevando a cabo, incluyendo la modificación de exosomas o microvesículas *in vitro* para poder ser utilizados como agentes transportadores de fármacos, direccionadas frente a un tipo celular particular mediante la inclusión de moléculas de reconocimiento en su membrana. Probablemente, el campo en el que más se ha avanzado hasta la fecha sea la utilización de VE derivadas de células madre mesenquimales. Desde 2010, se han publicado 80 artículos abordando el potencial terapéutico de estas VE en modelos animales, que actúan en muchos casos reproduciendo el mismo efecto que las células de las que provienen sin necesidad de utilizar la terapia celular. Se ha observado en diferentes órganos como su uso promueve la angiogénesis, disminuye el estrés oxidativo y la fibrosis, aunque quizás su efecto más destacado sea la capacidad inmunoreguladora que manifiestan en numerosos modelos de enfermedad (Börger et al., 2017).

No obstante, en ambos casos se requieren infraestructuras adecuadas para su extracción, modificación y almacenaje, así como el desarrollo de biorreactores que aumenten la producción disponible. De este modo, la sociedad internacional para el estudio de las VE (ISEV) ha publicado una guía de recomendaciones para el uso de las VE como terapia en ensayos clínicos (Lener et al., 2015).

Este escenario es ya una realidad. A día de hoy, la página web del NIH estadounidense sobre ensayos clínicos (www.clinicaltrials.gov) recoge la existencia de 60 ensayos con la palabra clave “exosoma” (11 de ellos activos o ya completados) y casi 200 que incluyen la palabra “microvesícula” o “micropartícula” (100 de ellos en marcha o ya finalizados).

CONCLUSIONES

1. Los niveles de ARNm de genes asociados a podocitos disminuyen mientras los proteicos aumentan significativamente en el sedimento urinario de pacientes hipertensos con microalbuminuria frente a los normoalbuminúricos. En ambos casos los niveles se correlacionan con la excreción urinaria de albúmina, confirmando la presencia de daño glomerular incipiente en la microalbuminuria y un cambio en el fenotipo de los podocitos de los pacientes a medida que esta aumenta.
2. Se ha verificado un correcto aislamiento y caracterización de exosomas y microvesículas de orina y plasma de pacientes hipertensos. Los análisis del ARN vesicular demuestran la abundancia de ARNs pequeños, donde se encuentran los micro ARNs.
3. En orina, los niveles de miR-335* y miR-146a están aumentados en exosomas de pacientes hipertensos con respecto a los niveles microvesiculares. El desarrollo de microalbuminuria reduce significativamente un 60% los niveles de miR-146a sólo en exosomas, enfatizando la existencia de un transporte selectivo de micro ARNs vía exosomal que cambia durante la progresión de la enfermedad.
4. El establecimiento de un protocolo optimizado para generar librerías de NGS a partir de ARN exosomal y plasmático ha permitido una mejora en la calidad y profundidad de la secuenciación, dando lugar a un mayor número de lecturas tanto para micro ARNs como para otros tipos de ARN pequeños.
5. Se ha establecido un perfil de 29 micro ARNs diferencialmente expresados en pacientes hipertensos con microalbuminuria. Estos micro ARNs participan en la regulación de numerosos procesos biológicos que pueden desencadenar el inicio y la progresión del daño glomerular, afectando a vías de señalización clave en podocitos, células endoteliales y mesangiales.
6. Los niveles de miR-26a-5p disminuyen significativamente en exosomas de orina de pacientes hipertensos con microalbuminuria y se correlacionan inversamente con la excreción urinaria de albúmina. Este hecho, así como su participación en vías clave en el desarrollo y mantenimiento de la barrera de filtración glomerular, lo convierten en un potencial biomarcador diagnóstico y pronóstico en la aparición y evolución de lesión glomerular en la hipertensión arterial.

7. Nuestros datos demuestran el interés del estudio de micro ARNs transportados por exosomas de orina y plasma para entender los mecanismos de lesión implicados en el desarrollo de daño orgánico durante el curso de la hipertensión arterial esencial.

REFERENCIAS

- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*, 113(1), 1-11.
- Alevizos, I., & Illei, G. G. (2010). MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases. *Nature Reviews.Rheumatology*, 6(7), 391-398.
- Al-Kafaji, G., Al-Mahroos, G., Al-Muhtareh, H. A., Skrypnyk, C., Sabry, M. A., & Ramadan, A. R. (2016). Decreased expression of circulating microRNA-126 in patients with type 2 diabetic nephropathy: A potential blood-based biomarker. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(2), 815-822.
- Alvarez, M. L., Khosroheidari, M., Kanchi Ravi, R., & DiStefano, J. K. (2012). Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney International*, 82(9), 1024-1032.
- Alvarez-Garcia, I., & Miska, E. A. (2005). MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development (Cambridge, England)*, 132(21), 4653-4662.
- Amabile, N., Cheng, S., Renard, J. M., Larson, M. G., Ghorbani, A., McCabe, E., et al. (2014). Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the framingham heart study. *European Heart Journal*, 35(42), 2972-2979.
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350-355.
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq--a python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(2), 166-169.
- Argyropoulos, C., Wang, K., Bernardo, J., Ellis, D., Orchard, T., Galas, D., et al. (2015). Urinary MicroRNA profiling predicts the development of microalbuminuria in patients with type 1 diabetes. *Journal of Clinical Medicine*, 4(7), 1498-1517.
- Argyropoulos, C., Wang, K., McClarty, S., Huang, D., Bernardo, J., Ellis, D., et al. (2013). Urinary microRNA profiling in the nephropathy of type 1 diabetes. *PloS One*, 8(1), e54662.
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., et al. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 5003-5008.
- Ashley, F. W., Jr, & Kannel, W. B. (1974). Relation of weight change to changes in atherogenic traits: The framingham study. *Journal of Chronic Diseases*, 27(3), 103-114.
- Backes, C., Meder, B., Hart, M., Ludwig, N., Leidinger, P., Vogel, B., et al. (2016a). Prioritizing and selecting likely novel miRNAs from NGS data. *Nucleic Acids Research*, 44(6), e53.
- Backes, C., Khaleeq, Q. T., Meese, E., & Keller, A. (2016b). miEAA: MicroRNA enrichment analysis and annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W110-6.

- Baelde, H. J., Eikmans, M., Lappin, D. W., Doran, P. P., Hohenadel, D., Brinkkoetter, P. T., et al. (2007). Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy is associated with podocyte loss. *Kidney International*, 71(7), 637-645.
- Bai, X., Geng, J., Zhou, Z., Tian, J., & Li, X. (2016). MicroRNA-130b improves renal tubulointerstitial fibrosis via repression of snail-induced epithelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy. *Scientific Reports*, 6, 20475.
- Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., et al. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, 14(7), 677-685.
- Bakouboula, B., Morel, O., Faure, A., Zobairi, F., Jesel, L., Trinh, A., et al. (2008). Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177(5), 536-543.
- Bao, M. H., Feng, X., Zhang, Y. W., Lou, X. Y., Cheng, Y., & Zhou, H. H. (2013). Let-7 in cardiovascular diseases, heart development and cardiovascular differentiation from stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 23086-23102.
- Barbieri, M., Ferrucci, L., Corsi, A. M., Macchi, C., Lauretani, F., Bonafe, M., et al. (2003). Is chronic inflammation a determinant of blood pressure in the elderly? *American Journal of Hypertension*, 16(7), 537-543.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233.
- Bartlett, C. S., Jeansson, M., & Quaggin, S. E. (2016). Vascular growth factors and glomerular disease. *Annual Review of Physiology*, 78, 437-461.
- Barutta, F., Tricarico, M., Corbelli, A., Annaratone, L., Pinach, S., Grimaldi, S., et al. (2013). Urinary exosomal microRNAs in incipient diabetic nephropathy. *PloS One*, 8(11), e73798.
- Bellingham, S. A., Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2012). Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Research*, 40(21), 10937-10949.
- Berezin, A., Zulli, A., Kerrigan, S., Petrovic, D., & Kruzliak, P. (2015). Predictive role of circulating endothelial-derived microparticles in cardiovascular diseases. *Clinical Biochemistry*, 48(9), 562-568.
- Bjarnegard, M., Enge, M., Norlin, J., Gustafsdottir, S., Fredriksson, S., Abramsson, A., et al. (2004). Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities. *Development (Cambridge, England)*, 131(8), 1847-1857.
- Blank, A., & Dekker, C. A. (1981). Ribonucleases of human serum, urine, cerebrospinal fluid, and leukocytes. activity staining following electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Biochemistry*, 20(8), 2261-2267.

- Blondal, T., Brunetto, M. R., Cavallone, D., Mikkelsen, M., Thorsen, M., Mang, Y., et al. (2017). Genome-wide comparison of next-generation sequencing and qPCR platforms for microRNA profiling in serum. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1580, 21-44.
- Boettger, T., Beetz, N., Kostin, S., Schneider, J., Kruger, M., Hein, L., et al. (2009). Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2634-2647.
- Borger, V., Bremer, M., Ferrer-Tur, R., Gockeln, L., Stambouli, O., Becic, A., et al. (2017). Mesenchymal Stem/Stromal cell-derived extracellular vesicles and their potential as novel immunomodulatory therapeutic agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 10.3390/ijms18071450.
- Bottinger, E. P., & Bitzer, M. (2002). TGF-beta signaling in renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(10), 2600-2610.
- Boulanger, C. M., Scoazec, A., Ebrahimian, T., Henry, P., Mathieu, E., Tedgui, A., et al. (2001). Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation*, 104(22), 2649-2652.
- Bracken, C. P., Scott, H. S., & Goodall, G. J. (2016). A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nature Reviews.Genetics*, 17(12), 719-732.
- Brown, E. J., Schlondorff, J. S., Becker, D. J., Tsukaguchi, H., Tonna, S. J., Uscinski, A. L., et al. (2010). Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Genetics*, 42(1), 72-76.
- Buck, A. H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H. J., Quintana, J. F., Le Bihan, T., et al. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature Communications*, 5, 5488.
- Burger, D., Montezano, A. C., Nishigaki, N., He, Y., Carter, A., & Touyz, R. M. (2011). Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via ang II receptor type I/NADPH oxidase/ rho kinase pathways targeted to lipid rafts. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(8), 1898-1907.
- Burger, D., Thibodeau, J. F., Holterman, C. E., Burns, K. D., Touyz, R. M., & Kennedy, C. R. (2014). Urinary podocyte microparticles identify prealbuminuric diabetic glomerular injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 25(7), 1401-1407.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622.
- Bye, A., Rosjo, H., Nauman, J., Silva, G. J., Follestad, T., Omland, T., et al. (2016). Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals - the HUNT study. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 97, 162-168.

- Byron, A., Randles, M. J., Humphries, J. D., Mironov, A., Hamidi, H., Harris, S., et al. (2014). Glomerular cell cross-talk influences composition and assembly of extracellular matrix. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 25(5), 953-966.
- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews.Cancer*, 6(11), 857-866.
- Campese, V. M., Bianchi, S., & Bigazzi, R. (1999). Association between hyperlipidemia and microalbuminuria in essential hypertension. *Kidney International.Supplement*, 71, S10-3.
- Carson, J. M., Okamura, K., Wakashin, H., McFann, K., Dobrinskikh, E., Kopp, J. B., et al. (2014). Podocytes degrade endocytosed albumin primarily in lysosomes. *PloS One*, 9(6), e99771.
- Cerasola, G., Cottone, S., & Mule, G. (2010). The progressive pathway of microalbuminuria: From early marker of renal damage to strong cardiovascular risk predictor. *Journal of Hypertension*, 28(12), 2357-2369.
- Chandrasekaran, K., Karolina, D. S., Sepramaniam, S., Armugam, A., Wintour, E. M., Bertram, J. F., et al. (2012). Role of microRNAs in kidney homeostasis and disease. *Kidney International*, 81(7), 617-627.
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., et al. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20), e179.
- Chen, X., Liang, H., Guan, D., Wang, C., Hu, X., Cui, L., et al. (2013). A combination of let-7d, let-7g and let-7i serves as a stable reference for normalization of serum microRNAs. *PloS One*, 8(11), e79652.
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C. Y. (2012). Horizontal transfer of microRNAs: Molecular mechanisms and clinical applications. *Protein & Cell*, 3(1), 28-37.
- Cheng, L., Sun, X., Scicluna, B. J., Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2014). Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine. *Kidney International*, 86(2), 433-444.
- Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo, J. L., Jr, et al. (2003). The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: The JNC 7 report. *Jama*, 289(19), 2560-2572.
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047-1058.
- Clayton, A., Turkes, A., Dewitt, S., Steadman, R., Mason, M. D., & Hallett, M. B. (2004). Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: The role of integrins. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(9), 977-979.
- Cocucci, E., Racchetti, G., & Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: Artefacts no more. *Trends in Cell Biology*, 19(2), 43-51.

- Collino, F., Pomatto, M., Bruno, S., Lindoso, R. S., Tapparo, M., Sicheng, W., et al. (2017). Exosome and microvesicle-enriched fractions isolated from mesenchymal stem cells by gradient separation showed different molecular signatures and functions on renal tubular epithelial cells. *Stem Cell Reviews*, 13(2), 226-243.
- Colosia, A. D., Palencia, R., & Khan, S. (2013). Prevalence of hypertension and obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in observational studies: A systematic literature review. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity : Targets and Therapy*, 6, 327-338.
- Comper, W. D., Hilliard, L. M., Nikolic-Paterson, D. J., & Russo, L. M. (2008). Disease-dependent mechanisms of albuminuria. *American Journal of Physiology.Renal Physiology*, 295(6), F1589-600.
- Cooper, M. E. (2001). Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia*, 44(11), 1957-1972.
- Cuspidi, C., Valerio, C., Giudici, V., Negri, F., Sala, C., Zanchetti, A., et al. (2008). Metabolic syndrome and multiple organ damage in essential hypertension. *Blood Pressure*, 17(4), 195-203.
- Cutler, D. J., & Jensen, J. D. (2010). To pool, or not to pool? *Genetics*, 186(1), 41-43.
- Dabney, J., & Meyer, M. (2012). Length and GC-biases during sequencing library amplification: A comparison of various polymerase-buffer systems with ancient and modern DNA sequencing libraries. *Biotechniques*, 52(2), 87-94.
- Daehn, I., Casalena, G., Zhang, T., Shi, S., Fenninger, F., Barasch, N., et al. (2014). Endothelial mitochondrial oxidative stress determines podocyte depletion in segmental glomerulosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(4), 1608-1621.
- Dane, M. J., van den Berg, B. M., Avramut, M. C., Faas, F. G., van der Vlag, J., Rops, A. L., et al. (2013). Glomerular endothelial surface layer acts as a barrier against albumin filtration. *The American Journal of Pathology*, 182(5), 1532-1540.
- de la Cuesta, F., Baldan-Martin, M., Moreno-Luna, R., Alvarez-Llamas, G., Gonzalez-Calero, L., Mourino-Alvarez, L., et al. (2017). Kalirin and CHD7: Novel endothelial dysfunction indicators in circulating extracellular vesicles from hypertensive patients with albuminuria. *Oncotarget*, 8(9), 15553-15562.
- de Leeuw, P. W., Ruilope, L. M., Palmer, C. R., Brown, M. J., Castaigne, A., Mancia, G., et al. (2004). Clinical significance of renal function in hypertensive patients at high risk: Results from the INSIGHT trial. *Archives of Internal Medicine*, 164(22), 2459-2464.
- Deen, W. M., Lazzara, M. J., & Myers, B. D. (2001). Structural determinants of glomerular permeability. *American Journal of Physiology.Renal Physiology*, 281(4), F579-96.
- Delic, D., Eisele, C., Schmid, R., Baum, P., Wiech, F., Gerl, M., et al. (2016). Urinary exosomal miRNA signature in type II diabetic nephropathy patients. *PloS One*, 11(3), e0150154.

- DeMarco, V. G., Aroor, A. R., & Sowers, J. R. (2014). The pathophysiology of hypertension in patients with obesity. *Nature Reviews.Endocrinology*, 10(6), 364-376.
- Dennler, S., Goumans, M. J., & ten Dijke, P. (2002). Transforming growth factor beta signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology*, 71(5), 731-740.
- Dentelli, P., Rosso, A., Orso, F., Olgasi, C., Taverna, D., & Brizzi, M. F. (2010). microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(8), 1562-1568.
- Derynck, R., & Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425(6958), 577-584.
- Dey, B. K., Gagan, J., Yan, Z., & Dutta, A. (2012). miR-26a is required for skeletal muscle differentiation and regeneration in mice. *Genes & Development*, 26(19), 2180-2191.
- Di Santo, S., Yang, Z., Wyler von Ballmoos, M., Voelzmann, J., Diehm, N., Baumgartner, I., et al. (2009). Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: In vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One*, 4(5), e5643.
- Diercks, G. F., van Boven, A. J., Hillege, J. L., de Jong, P. E., Rouleau, J. L., & van Gilst, W. H. (2002). The importance of microalbuminuria as a cardiovascular risk indicator: A review. *The Canadian Journal of Cardiology*, 18(5), 525-535.
- Dixit, M., Loot, A. E., Mohamed, A., Fisslthaler, B., Boulanger, C. M., Ceacareanu, B., et al. (2005). Gab1, SHP2, and protein kinase A are crucial for the activation of the endothelial NO synthase by fluid shear stress. *Circulation Research*, 97(12), 1236-1244.
- Donoviel, D. B., Freed, D. D., Vogel, H., Potter, D. G., Hawkins, E., Barrish, J. P., et al. (2001). Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Molecular and Cellular Biology*, 21(14), 4829-4836.
- Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J., Hole, P., et al. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using nanoparticle tracking analysis. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(6), 780-788.
- Dryer, S. E., & Reiser, J. (2010). TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: Role in glomerular filtration and pathophysiology. *American Journal of Physiology.Renal Physiology*, 299(4), F689-701.
- Edgley, A. J., Kett, M. M., & Anderson, W. P. (2003). Evidence for renal vascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *Journal of Hypertension*, 21(7), 1401-1406.
- Ehret, G. B., & Caulfield, M. J. (2013). Genes for blood pressure: An opportunity to understand hypertension. *European Heart Journal*, 34(13), 951-961.
- El-Aouni, C., Herbach, N., Blattner, S. M., Henger, A., Rastaldi, M. P., Jarad, G., et al. (2006). Podocyte-specific deletion of integrin-linked kinase results in severe glomerular basement membrane alterations and progressive glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 17(5), 1334-1344.

- Emde, A., & Hornstein, E. (2014). miRNAs at the interface of cellular stress and disease. *The EMBO Journal*, 33(13), 1428-1437.
- Eremina, V., Sood, M., Haigh, J., Nagy, A., Lajoie, G., Ferrara, N., et al. (2003). Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(5), 707-716.
- ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. (2013). 2013 practice guidelines for the management of arterial hypertension of the european society of hypertension (ESH) and the european society of cardiology (ESC): ESH/ESC task force for the management of arterial hypertension. *Journal of Hypertension*, 31(10), 1925-1938.
- Eskildsen, T. V., Jeppesen, P. L., Schneider, M., Nossent, A. Y., Sandberg, M. B., Hansen, P. B., et al. (2013). Angiotensin II regulates microRNA-132/-212 in hypertensive rats and humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11190-11207.
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews.Genetics*, 12(12), 861-874.
- EV-TRACK Consortium, Van Deun, J., Mestdagh, P., Agostinis, P., Akay, O., Anand, S., et al. (2017). EV-TRACK: Transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nature Methods*, 14(3), 228-232.
- Eyre, J., Burton, J. O., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Topham, P. S., & Brunskill, N. J. (2011). Monocyte- and endothelial-derived microparticles induce an inflammatory phenotype in human podocytes. *Nephron.Experimental Nephrology*, 119(3), e58-66.
- Fang, D. Y., King, H. W., Li, J. Y., & Gleadle, J. M. (2013). Exosomes and the kidney: Blaming the messenger. *Nephrology (Carlton, Vic.)*, 18(1), 1-10.
- Fernandez-Llama, P., Khositseth, S., Gonzales, P. A., Star, R. A., Pisitkun, T., & Knepper, M. A. (2010). Tamm-horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney International*, 77(8), 736-742.
- Fevrier, B., & Raposo, G. (2004). Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(4), 415-421.
- Fleury, A., Martinez, M. C., & Le Lay, S. (2014). Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases. *Frontiers in Immunology*, 5, 370.
- Foster, R. R., Slater, S. C., Seckley, J., Kerjaschki, D., Bates, D. O., Mathieson, P. W., et al. (2008). Vascular endothelial growth factor-C, a potential paracrine regulator of glomerular permeability, increases glomerular endothelial cell monolayer integrity and intracellular calcium. *The American Journal of Pathology*, 173(4), 938-948.
- Freedman, J. E., Gerstein, M., Mick, E., Rozowsky, J., Levy, D., Kitchen, R., et al. (2016). Diverse human extracellular RNAs are widely detected in human plasma. *Nature Communications*, 7, 11106.

- Gagliardini, E., Conti, S., Benigni, A., Remuzzi, G., & Remuzzi, A. (2010). Imaging of the porous ultrastructure of the glomerular epithelial filtration slit. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21(12), 2081-2089.
- Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., & Illei, G. G. (2012). The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PloS One*, 7(3), e30679.
- Gallo, S., Gili, M., Lombardo, G., Rossetti, A., Rosso, A., Dentelli, P., et al. (2016). Stem cell-derived, microRNA-carrying extracellular vesicles: A novel approach to interfering with mesangial cell collagen production in a hyperglycaemic setting. *PloS One*, 11(9), e0162417.
- Garcia-Contreras, M., Shah, S. H., Tamayo, A., Robbins, P. D., Golberg, R. B., Mendez, A. J., et al. (2017). Plasma-derived exosome characterization reveals a distinct microRNA signature in long duration type 1 diabetes. *Scientific Reports*, 7(1), 5998-017-05787-y.
- Gatti, S., Bruno, S., Deregibus, M. C., Sordi, A., Cantaluppi, V., Tetta, C., et al. (2011). Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 26(5), 1474-1483.
- Gerstein, H. C., Mann, J. F., Yi, Q., Zinman, B., Dinneen, S. F., Hoogwerf, B., et al. (2001). Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *Jama*, 286(4), 421-426.
- Gheldof, D., Hardij, J., Cecchet, F., Chatelain, B., Dogne, J. M., & Mullier, F. (2013). Thrombin generation assay and transmission electron microscopy: A useful combination to study tissue factor-bearing microvesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2, 10.3402/jev.v2i0.19728. eCollection 2013.
- Gildea, J. J., Carlson, J. M., Schoeffel, C. D., Carey, R. M., & Felder, R. A. (2013). Urinary exosome miRNome analysis and its applications to salt sensitivity of blood pressure. *Clinical Biochemistry*, 46(12), 1131-1134.
- González-Maqueda, I. (2007). La microalbuminuria como factor pronóstico en el enfermo cardiovascular. *Revista Española De Cardiología*, 7, 31-43; 43.
- Gonzales, P. A., Pisitkun, T., Hoffert, J. D., Tchapyjnikov, D., Star, R. A., Kleta, R., et al. (2009). Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(2), 363-379.
- Gonzalez-Calero, L., Martinez, P. J., Martin-Lorenzo, M., Baldan-Martin, M., Ruiz-Hurtado, G., la Cuesta, F., et al. (2017). Urinary exosomes reveal protein signatures in hypertensive patients with albuminuria. *Oncotarget*, 8(27), 44217-44231.
- Gonzalez-Quintero, V. H., Smarkusky, L. P., Jimenez, J. J., Mauro, L. M., Jy, W., Hortsman, L. L., et al. (2004). Elevated plasma endothelial microparticles: Preeclampsia versus gestational hypertension. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191(4), 1418-1424.

- Goto, S., Bono, H., Ogata, H., Fujibuchi, W., Nishioka, T., Sato, K., et al. (1997). Organizing and computing metabolic pathway data in terms of binary relations. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 175-186.
- Gracia, T., Wang, X., Su, Y., Norgett, E. E., Williams, T. L., Moreno, P., et al. (2017). Urinary exosomes contain MicroRNAs capable of paracrine modulation of tubular transporters in kidney. *Scientific Reports*, 7, 40601.
- Gray, C., Harrison, C. J., Segovia, S. A., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2015). Maternal salt and fat intake causes hypertension and sustained endothelial dysfunction in fetal, weanling and adult male resistance vessels. *Scientific Reports*, 5, 9753.
- Greka, A., & Mundel, P. (2012a). Cell biology and pathology of podocytes. *Annual Review of Physiology*, 74, 299-323.
- Greka, A., & Mundel, P. (2012b). Calcium regulates podocyte actin dynamics. *Seminars in Nephrology*, 32(4), 319-326.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S., & Enright, A. J. (2008). miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue), D154-8.
- Gruden, G., Perin, P. C., & Camussi, G. (2005). Insight on the pathogenesis of diabetic nephropathy from the study of podocyte and mesangial cell biology. *Current Diabetes Reviews*, 1(1), 27-40.
- Guha, M., Xu, Z. G., Tung, D., Lanting, L., & Natarajan, R. (2007). Specific down-regulation of connective tissue growth factor attenuates progression of nephropathy in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(12), 3355-3368.
- Guo, J. K., Menke, A. L., Gubler, M. C., Clarke, A. R., Harrison, D., Hammes, A., et al. (2002). WT1 is a key regulator of podocyte function: Reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 11(6), 651-659.
- Gyorgy, B., Modos, K., Pallinger, E., Paloczi, K., Pasztoi, M., Misjak, P., et al. (2011). Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood*, 117(4), e39-48.
- Hall, J. E., Brands, M. W., & Henegar, J. R. (1999). Angiotensin II and long-term arterial pressure regulation: The overriding dominance of the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 10 Suppl 12, S258-65.
- Hall, J. E., do Carmo, J. M., da Silva, A. A., Wang, Z., & Hall, M. E. (2015). Obesity-induced hypertension: Interaction of neurohumoral and renal mechanisms. *Circulation Research*, 116(6), 991-1006.
- Hanin, G., Shenhar-Tsarfaty, S., Yayon, N., Yau, Y. H., Bennett, E. R., Sklan, E. H., et al. (2014). Competing targets of microRNA-608 affect anxiety and hypertension. *Human Molecular Genetics*, 23(17), 4569-4580.

- Hara, M., Yanagihara, T., & Kihara, I. (2001). Urinary podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron*, 89(3), 342-347.
- Haraldsson, B. S. (2014). The endothelium as part of the integrative glomerular barrier complex. *Kidney International*, 85(1), 8-11.
- Henry, S. L., Barzel, B., Wood-Bradley, R. J., Burke, S. L., Head, G. A., & Armitage, J. A. (2012). Developmental origins of obesity-related hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 39(9), 799-806.
- Hergenreider, E., Heydt, S., Treguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A. J., Zeiher, A. M., et al. (2012). Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nature Cell Biology*, 14(3), 249-256.
- Herman-Edelstein, M., Thomas, M. C., Thallas-Bonke, V., Saleem, M., Cooper, M. E., & Kantharidis, P. (2011). Dedifferentiation of immortalized human podocytes in response to transforming growth factor-beta: A model for diabetic podocytopathy. *Diabetes*, 60(6), 1779-1788.
- Hill, A. F., Pegtel, D. M., Lambertz, U., Leonardi, T., O'Driscoll, L., Pluchino, S., et al. (2013). ISEV position paper: Extracellular vesicle RNA analysis and bioinformatics. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2, 10.3402/jev.v2i0.22859. eCollection 2013.
- Ho, J., Ng, K. H., Rosen, S., Dostal, A., Gregory, R. I., & Kreidberg, J. A. (2008). Podocyte-specific loss of functional microRNAs leads to rapid glomerular and tubular injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 19(11), 2069-2075.
- Hsu, C. Y., Huang, P. H., Chiang, C. H., Leu, H. B., Huang, C. C., Chen, J. W., et al. (2013). Increased circulating endothelial apoptotic microparticle to endothelial progenitor cell ratio is associated with subsequent decline in glomerular filtration rate in hypertensive patients. *PloS One*, 8(7), e68644.
- Huang, H., You, Y., Lin, X., Tang, C., Gu, X., Huang, M., et al. (2017). Inhibition of TRPC6 signal pathway alleviates podocyte injury induced by TGF-beta1. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 41(1), 163-172.
- Huang, P. H., Huang, S. S., Chen, Y. H., Lin, C. P., Chiang, K. H., Chen, J. S., et al. (2010). Increased circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles and decreased circulating endothelial progenitor cell levels in hypertensive patients with microalbuminuria. *Journal of Hypertension*, 28(8), 1655-1665.
- Huang, Y., Liu, Y., Li, L., Su, B., Yang, L., Fan, W., et al. (2014). Involvement of inflammation-related miR-155 and miR-146a in diabetic nephropathy: Implications for glomerular endothelial injury. *BMC Nephrology*, 15, 142-2369-15-142.
- Huang, Y., Tong, J., He, F., Yu, X., Fan, L., Hu, J., et al. (2015). miR-141 regulates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition through repression of HIPK2 expression in renal tubular epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(2), 311-318.

- Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix: Not just pretty fibrils. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5957), 1216-1219.
- Ibsen, H., Wachtell, K., Olsen, M. H., Borch-Johnsen, K., Lindholm, L. H., Mogensen, C. E., et al. (2004). Albuminuria and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: The LIFE study. *Kidney International.Supplement*, (92)(92), S56-8.
- Ichii, O., Otsuka-Kanazawa, S., Horino, T., Kimura, J., Nakamura, T., Matsumoto, M., et al. (2014). Decreased miR-26a expression correlates with the progression of podocyte injury in autoimmune glomerulonephritis. *PloS One*, 9(10), e110383.
- Icli, B., Wara, A. K., Moslehi, J., Sun, X., Plovie, E., Cahill, M., et al. (2013). MicroRNA-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling. *Circulation Research*, 113(11), 1231-1241.
- Iglesias-de la Cruz, M. C., Ziyadeh, F. N., Isono, M., Kouahou, M., Han, D. C., Kalluri, R., et al. (2002). Effects of high glucose and TGF-beta1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney International*, 62(3), 901-913.
- Izzo, J. L., Jr, & Taylor, A. A. (1999). The sympathetic nervous system and baroreflexes in hypertension and hypotension. *Current Hypertension Reports*, 1(3), 254-263.
- Jager, A., van Hinsbergh, V. W., Kostense, P. J., Emeis, J. J., Nijpels, G., Dekker, J. M., et al. (2002). C-reactive protein and soluble vascular cell adhesion molecule-1 are associated with elevated urinary albumin excretion but do not explain its link with cardiovascular risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(4), 593-598.
- Jansen, F., Wang, H., Przybilla, D., Franklin, B. S., Dolf, A., Pfeifer, P., et al. (2016). Vascular endothelial microparticles-incorporated microRNAs are altered in patients with diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetology*, 15, 49-016-0367-8.
- Jansen, F., Yang, X., Baumann, K., Przybilla, D., Schmitz, T., Flender, A., et al. (2015). Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(9), 2202-2214.
- Jeansson, M., & Haraldsson, B. (2006). Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. *American Journal of Physiology.Renal Physiology*, 290(1), F111-6.
- Jefferson, J. A., Shankland, S. J., & Pichler, R. H. (2008). Proteinuria in diabetic kidney disease: A mechanistic viewpoint. *Kidney International*, 74(1), 22-36.
- Jenkins, R. H., Martin, J., Phillips, A. O., Bowen, T., & Fraser, D. J. (2012). Pleiotropy of microRNA-192 in the kidney. *Biochemical Society Transactions*, 40(4), 762-767.
- Jia, Y., Guan, M., Zheng, Z., Zhang, Q., Tang, C., Xu, W., et al. (2016). miRNAs in urine extracellular vesicles as predictors of early-stage diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 7932765.

- Jiang, L., Ding, J., Tsai, H., Li, L., Feng, Q., Miao, J., et al. (2011). Over-expressing transient receptor potential cation channel 6 in podocytes induces cytoskeleton rearrangement through increases of intracellular Ca^{2+} and RhoA activation. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 236(2), 184-193.
- Kalani, A., Mohan, A., Godbole, M. M., Bhatia, E., Gupta, A., Sharma, R. K., et al. (2013). Wilm's tumor-1 protein levels in urinary exosomes from diabetic patients with or without proteinuria. *PloS One*, 8(3), e60177.
- Kandasamy, Y., Smith, R., Lumbers, E. R., & Rudd, D. (2014). Nephrin - a biomarker of early glomerular injury. *Biomarker Research*, 2, 21-7771-2-21. eCollection 2014.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2012). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue), D109-14.
- Kaplan, J. M., Kim, S. H., North, K. N., Rennke, H., Correia, L. A., Tong, H. Q., et al. (2000). Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Genetics*, 24(3), 251-256.
- Kapustin, A. N., Chatrou, M. L., Drozdov, I., Zheng, Y., Davidson, S. M., Soong, D., et al. (2015). Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circulation Research*, 116(8), 1312-1323.
- Karolina, D. S., Tavintharan, S., Armugam, A., Sepramaniam, S., Pek, S. L., Wong, M. T., et al. (2012). Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(12), E2271-6.
- Keller, A., Leidinger, P., Steinmeyer, F., Stahler, C., Franke, A., Hemmrich-Stanisak, G., et al. (2014). Comprehensive analysis of microRNA profiles in multiple sclerosis including next-generation sequencing. *Multiple Sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England), 20(3), 295-303.
- Kerjaschki, D., Sharkey, D. J., & Farquhar, M. G. (1984). Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *The Journal of Cell Biology*, 98(4), 1591-1596.
- Kim, S. H., Turnbull, J., & Guimond, S. (2011). Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *The Journal of Endocrinology*, 209(2), 139-151.
- Klag, M. J., Whelton, P. K., Randall, B. L., Neaton, J. D., Brancati, F. L., Ford, C. E., et al. (1996). Blood pressure and end-stage renal disease in men. *The New England Journal of Medicine*, 334(1), 13-18.
- Koga, K., Yokoi, H., Mori, K., Kasahara, M., Kuwabara, T., Imamaki, H., et al. (2015). MicroRNA-26a inhibits TGF-beta-induced extracellular matrix protein expression in podocytes by targeting CTGF and is downregulated in diabetic nephropathy. *Diabetologia*, 58(9), 2169-2180.

- Kolling, M., Kaucsar, T., Schauerte, C., Hubner, A., Dettling, A., Park, J. K., et al. (2017). Therapeutic miR-21 silencing ameliorates diabetic kidney disease in mice. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 25(1), 165-180.
- Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., de Menezes, R., Misovic, B., Wachalska, M., Geldof, A., et al. (2016). Noninvasive prostate cancer detection by measuring miRNA variants (isomiRs) in urine extracellular vesicles. *Oncotarget*, 7(16), 22566-22578.
- Kowal, J., Tkach, M., & Thery, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29, 116-125.
- Kozak, D., Anderson, W., Vogel, R., Chen, S., Antaw, F., & Trau, M. (2012). Simultaneous size and zeta-potential measurements of individual nanoparticles in dispersion using size-tunable pore sensors. *ACS Nano*, 6(8), 6990-6997.
- Kozarewa, I., Ning, Z., Quail, M. A., Sanders, M. J., Berriman, M., & Turner, D. J. (2009). Amplification-free illumina sequencing-library preparation facilitates improved mapping and assembly of (G+C)-biased genomes. *Nature Methods*, 6(4), 291-295.
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D68-73.
- Kriz, W., Hahnel, B., Hosser, H., Rosener, S., & Waldherr, R. (2014). Structural analysis of how podocytes detach from the glomerular basement membrane under hypertrophic stress. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 207.
- Kriz, W., & Lemley, K. V. (2015). A potential role for mechanical forces in the detachment of podocytes and the progression of CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 26(2), 258-269.
- Kroh, E. M., Parkin, R. K., Mitchell, P. S., & Tewari, M. (2010). Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods (San Diego, Calif.)*, 50(4), 298-301.
- Kwon, S. H., Woollard, J. R., Saad, A., Garovic, V. D., Zand, L., Jordan, K. L., et al. (2016). Elevated urinary podocyte-derived extracellular microvesicles in renovascular hypertensive patients. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*,
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357-359.
- Lasser, C., Alikhani, V. S., Ekstrom, K., Eldh, M., Paredes, P. T., Bossios, A., et al. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: Uptake by macrophages. *Journal of Translational Medicine*, 9, 9-5876-9-9.
- Lazaro-Ibanez, E., Sanz-Garcia, A., Visakorpi, T., Escobedo-Lucea, C., Siljander, P., Ayuso-Sacido, A., et al. (2014). Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. *The Prostate*, 74(14), 1379-1390.

- Lee, H. M., Nguyen, D. T., & Lu, L. F. (2014). Progress and challenge of microRNA research in immunity. *Frontiers in Genetics*, 5, 178.
- Lee, H. S. (2012). Mechanisms and consequences of TGF- β overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. *Cell and Tissue Research*, 347(1), 129-140.
- Lee, H. S., & Song, C. Y. (2010). Effects of TGF- β on podocyte growth and disease progression in proliferative podocytopathies. *Kidney & Blood Pressure Research*, 33(1), 24-29.
- Lee, J. Y., Park, K., Lee, E., Ahn, T., Jung, H. H., Lim, S. H., et al. (2016). Gene expression profiling of breast cancer brain metastasis. *Scientific Reports*, 6, 28623.
- Lemley, K. V., Lafayette, R. A., Safai, M., Derby, G., Blouch, K., Squarer, A., et al. (2002). Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney International*, 61(4), 1475-1485.
- Lener, T., Gimona, M., Aigner, L., Borger, V., Buzas, E., Camussi, G., et al. (2015). Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 30087.
- Lennon, R., Randles, M. J., & Humphries, M. J. (2014). The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 160.
- Leroyer, A. S., Anfosso, F., Lacroix, R., Sabatier, F., Simoncini, S., Njock, S. M., et al. (2010). Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thrombosis and Haemostasis*, 104(3), 456-463.
- Levy, D., Larson, M. G., Vasan, R. S., Kannel, W. B., & Ho, K. K. (1996). The progression from hypertension to congestive heart failure. *Jama*, 275(20), 1557-1562.
- Lewington, S., Clarke, R., Qizilbash, N., Peto, R., Collins, R., & Prospective Studies Collaboration. (2002). Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: A meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet (London, England)*, 360(9349), 1903-1913.
- Li, Y., Kang, Y. S., Dai, C., Kiss, L. P., Wen, X., & Liu, Y. (2008). Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *The American Journal of Pathology*, 172(2), 299-308.
- Li, Y., Zhang, L., Liu, F., Xiang, G., Jiang, D., & Pu, X. (2015). Identification of endogenous controls for analyzing serum exosomal miRNA in patients with hepatitis B or hepatocellular carcinoma. *Disease Markers*, 2015, 893594.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., et al. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027), 769-773.
- Lin, C. L., Lee, P. H., Hsu, Y. C., Lei, C. C., Ko, J. Y., Chuang, P. C., et al. (2014). MicroRNA-29a promotion of nephrin acetylation ameliorates hyperglycemia-induced podocyte dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 25(8), 1698-1709.

- Lindahl, P., Hellstrom, M., Kalen, M., Karlsson, L., Pekny, M., Pekna, M., et al. (1998). Paracrine PDGF-B/PDGF-rbeta signaling controls mesangial cell development in kidney glomeruli. *Development (Cambridge, England)*, 125(17), 3313-3322.
- Liu, L., Hu, X., Cai, G. Y., Lv, Y., Zhuo, L., Gao, J. J., et al. (2012). High glucose-induced hypertrophy of mesangial cells is reversed by connexin43 overexpression via PTEN/Akt/mTOR signaling. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 27(1), 90-100.
- Liu, X., Hong, Q., Wang, Z., Yu, Y., Zou, X., & Xu, L. (2016). Transforming growth factor-beta-sphingosine kinase 1/S1P signaling upregulates microRNA-21 to promote fibrosis in renal tubular epithelial cells. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 241(3), 265-272.
- Loeffler, I., & Wolf, G. (2014). Transforming growth factor-beta and the progression of renal disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 29 Suppl 1, i37-i45.
- Long, D. A., Price, K. L., Herrera-Acosta, J., & Johnson, R. J. (2004). How does angiotensin II cause renal injury? *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 43(4), 722-723.
- Long, X., & Miano, J. M. (2011). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) utilizes distinct pathways for the transcriptional activation of microRNA 143/145 in human coronary artery smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(34), 30119-30129.
- Lopez-Hernandez, F. J., & Lopez-Novoa, J. M. (2012). Role of TGF-beta in chronic kidney disease: An integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell and Tissue Research*, 347(1), 141-154.
- Lorenzen, J. M., Haller, H., & Thum, T. (2011). MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nature Reviews.Nephrology*, 7(5), 286-294.
- Lotvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzas, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., et al. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the international society for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3, 26913.
- Lu, J., Kwan, B. C., Lai, F. M., Tam, L. S., Li, E. K., Chow, K. M., et al. (2012). Glomerular and tubulointerstitial miR-638, miR-198 and miR-146a expression in lupus nephritis. *Nephrology (Carlton, Vic.)*, 17(4), 346-351.
- Lu, Q., Hope, L. W., Brasch, M., Reinhard, C., & Cohen, S. N. (2003). TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 7626-7631.
- Luo, Y., Wang, C., Chen, X., Zhong, T., Cai, X., Chen, S., et al. (2013). Increased serum and urinary microRNAs in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Clinical Chemistry*, 59(4), 658-666.
- Luque, M., de Rivas, B., Alvarez, B., Garcia, G., Fernandez, C., & Martell, N. (2006). Influence of target organ lesion detection (assessment of microalbuminuria and echocardiogram) in

- cardiovascular risk stratification and treatment of untreated hypertensive patients. *Journal of Human Hypertension*, 20(3), 187-192.
- Lv, C., Zhou, Y. H., Wu, C., Shao, Y., Lu, C. L., & Wang, Q. Y. (2015). The changes in miR-130b levels in human serum and the correlation with the severity of diabetic nephropathy. *Diabetes/metabolism Research and Reviews*, 31(7), 717-724.
- Lv, L. L., Cao, Y., Liu, D., Xu, M., Liu, H., Tang, R. N., et al. (2013). Isolation and quantification of microRNAs from urinary exosomes/microvesicles for biomarker discovery. *International Journal of Biological Sciences*, 9(10), 1021-1031.
- Lv, L. L., Cao, Y. H., Ni, H. F., Xu, M., Liu, D., Liu, H., et al. (2013). MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 305(8), F1220-7.
- Lv, L. L., Cao, Y. H., Pan, M. M., Liu, H., Tang, R. N., Ma, K. L., et al. (2014). CD2AP mRNA in urinary exosome as biomarker of kidney disease. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 428, 26-31.
- Ma, H., Togawa, A., Soda, K., Zhang, J., Lee, S., Ma, M., et al. (2010). Inhibition of podocyte FAK protects against proteinuria and foot process effacement. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21(7), 1145-1156.
- Ma, X., Lu, C., Lv, C., Wu, C., & Wang, Q. (2016). The expression of miR-192 and its significance in diabetic nephropathy patients with different urine albumin creatinine ratio. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 6789402.
- Maas, S. L., De Vrij, J., & Broekman, M. L. (2014). Quantification and size-profiling of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (92):e51623. doi(92), e51623.
- Maas, S. L., de Vrij, J., van der Vlist, E. J., Geragousian, B., van Bloois, L., Mastrobattista, E., et al. (2015). Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 200, 87-96.
- Macconi, D., Bonomelli, M., Benigni, A., Plati, T., Sangalli, F., Longaretti, L., et al. (2006). Pathophysiologic implications of reduced podocyte number in a rat model of progressive glomerular injury. *The American Journal of Pathology*, 168(1), 42-54.
- Mancia, G. (2005). The association of hypertension and diabetes: Prevalence, cardiovascular risk and protection by blood pressure reduction. *Acta Diabetologica*, 42 Suppl 1, S17-25.
- Mancia, G., Fagard, R., Narkiewicz, K., Redon, J., Zanchetti, A., Bohm, M., et al. (2014a). 2013 ESH/ESC practice guidelines for the management of arterial hypertension. *Blood Pressure*, 23(1), 3-16.
- Mancia, G., & Grassi, G. (2014b). The autonomic nervous system and hypertension. *Circulation Research*, 114(11), 1804-1814.

- Marques, F. K., Campos, F. M., Sousa, L. P., Teixeira-Carvalho, A., Dusse, L. M., & Gomes, K. B. (2013). Association of microparticles and preeclampsia. *Molecular Biology Reports*, 40(7), 4553-4559.
- Marques, F. Z., Campain, A. E., Tomaszewski, M., Zukowska-Szczechowska, E., Yang, Y. H., Charchar, F. J., et al. (2011). Gene expression profiling reveals renin mRNA overexpression in human hypertensive kidneys and a role for microRNAs. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 58(6), 1093-1098.
- Marrachelli, V. G., Monleon, D., Rentero, P., Mansego, M. L., Morales, J. M., Galan, I., et al. (2014). Genomic and metabolomic profile associated to microalbuminuria. *PloS One*, 9(2), e98227.
- Martell, N., Alvarez-Alvarez, B., & Fernandez-Cruz, A. (2010). Influence of metabolic syndrome on risk stratification in hypertensive patients: Differences between 2003 and 2007 ESH-ESC guidelines. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 4(2), 97-103.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), pp. 10-12.
- Martinez, F., Mansego, M. L., Chaves, F. J., & Redon, J. (2010). Genetic bases of urinary albumin excretion and related traits in hypertension. *Journal of Hypertension*, 28(2), 213-225.
- Mateescu, B., Kowal, E. J., van Balkom, B. W., Bartel, S., Bhattacharyya, S. N., Buzas, E. I., et al. (2017). Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1), 1286095.
- Mathivanan, S., Lim, J. W., Tauro, B. J., Ji, H., Moritz, R. L., & Simpson, R. J. (2010). Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 9(2), 197-208.
- May, C. J., Saleem, M., & Welsh, G. I. (2014). Podocyte dedifferentiation: A specialized process for a specialized cell. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 148.
- Menéndez, E., Delgado, E., Fernández-Vega, F., Prieto, M. A., Bordiá, E., Calle, A., et al. (2016). Prevalencia, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial en España. resultados del estudio Di@bet.es. *Revista Española De Cardiología*, 69(06), 572-578; 578.
- Messerli, F. H., Williams, B., & Ritz, E. (2007). Essential hypertension. *Lancet (London, England)*, 370(9587), 591-603.
- Meyer, S. U., Pfaffl, M. W., & Ulbrich, S. E. (2010). Normalization strategies for microRNA profiling experiments: A 'normal' way to a hidden layer of complexity? *Biotechnology Letters*, 32(12), 1777-1788.
- Mills, K. T., Bundy, J. D., Kelly, T. N., Reed, J. E., Kearney, P. M., Reynolds, K., et al. (2016). Global disparities of hypertension prevalence and control: A systematic analysis of population-based studies from 90 countries. *Circulation*, 134(6), 441-450.

- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., et al. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30), 10513-10518.
- Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M. A., et al. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature Communications*, 2, 282.
- Mohamed, J. S., Hajira, A., Li, Z., Paulin, D., & Boriek, A. M. (2011). Desmin regulates airway smooth muscle hypertrophy through early growth-responsive protein-1 and microRNA-26a. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(50), 43394-43404.
- Mohan, A., Singh, R. S., Kumari, M., Garg, D., Upadhyay, A., Ecelbarger, C. M., et al. (2016). Urinary exosomal microRNA-451-5p is a potential early biomarker of diabetic nephropathy in rats. *PloS One*, 11(4), e0154055.
- Moller, C. C., Flesche, J., & Reiser, J. (2009). Sensitizing the slit diaphragm with TRPC6 ion channels. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(5), 950-953.
- Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Mantel, P. Y., Halleck, A. E., Trachtenberg, A. J., et al. (2013). Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biological Chemistry*, 394(10), 1253-1262.
- Montaner, S., Galiano, A., Trelis, M., Martin-Jaular, L., Del Portillo, H. A., Bernal, D., et al. (2014). The role of extracellular vesicles in modulating the host immune response during parasitic infections. *Frontiers in Immunology*, 5, 433.
- Mueller-Deile, J., Kumpers, P., Achenbach, J., Park, J. K., Mengel, M., Haller, H., et al. (2012). Podocalyxin-positive glomerular epithelial cells in urine correlate with a positive outcome in FSGS. *Journal of Nephrology*, 25(5), 802-809.
- Muller-Deile, J., Gellrich, F., Schenk, H., Schroder, P., Nystrom, J., Lorenzen, J., et al. (2016). Overexpression of TGF-beta inducible microRNA-143 in zebrafish leads to impairment of the glomerular filtration barrier by targeting proteoglycans. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 40(5), 819-830.
- Muller-Deile, J., & Schiffer, M. (2017). Podocytes from the diagnostic and therapeutic point of view. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 469(7-8), 1007-1015.
- Munari, E., Marchionni, L., Chitre, A., Hayashi, M., Martignoni, G., Brunelli, M., et al. (2014). Clear cell papillary renal cell carcinoma: Micro-RNA expression profiling and comparison with clear cell renal cell carcinoma and papillary renal cell carcinoma. *Human Pathology*, 45(6), 1130-1138.
- Mundel, P., & Shankland, S. J. (2002). Podocyte biology and response to injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(12), 3005-3015.

- Nakatsue, T., Koike, H., Han, G. D., Suzuki, K., Miyauchi, N., Yuan, H., et al. (2005). Nephrin and podocin dissociate at the onset of proteinuria in experimental membranous nephropathy. *Kidney International*, 67(6), 2239-2253.
- Nassirpour, R., Mathur, S., Gosink, M. M., Li, Y., Shoieb, A. M., Wood, J., et al. (2014). Identification of tubular injury microRNA biomarkers in urine: Comparison of next-generation sequencing and qPCR-based profiling platforms. *BMC Genomics*, 15, 485-2164-15-485.
- Navickas, R., Gal, D., Laucevicius, A., Taparauskaite, A., Zdanyte, M., & Holvoet, P. (2016). Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: A systematic review. *Cardiovascular Research*, 111(4), 322-337.
- Neal, C. S., Michael, M. Z., Pimlott, L. K., Yong, T. Y., Li, J. Y., & Gleadle, J. M. (2011). Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 26(11), 3794-3802.
- Ng, D. P., Tai, B. C., Tan, E., Leong, H., Nurbaya, S., Lim, X. L., et al. (2011). Nephrinuria associates with multiple renal traits in type 2 diabetes. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 26(8), 2508-2514.
- Nguyen, T. Q., Roestenberg, P., van Nieuwenhoven, F. A., Bovenschen, N., Li, Z., Xu, L., et al. (2008). CTGF inhibits BMP-7 signaling in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 19(11), 2098-2107.
- Nicolaou, N., Margadant, C., Kevelam, S. H., Lilien, M. R., Oosterveld, M. J., Kreft, M., et al. (2012). Gain of glycosylation in integrin alpha3 causes lung disease and nephrotic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(12), 4375-4387.
- Nielsen, C. T., Ostergaard, O., Johnsen, C., Jacobsen, S., & Heegaard, N. H. (2011). Distinct features of circulating microparticles and their relationship to clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 63(10), 3067-3077.
- O'Donnell, C. J., Lindpaintner, K., Larson, M. G., Rao, V. S., Ordovas, J. M., Schaefer, E. J., et al. (1998). Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the framingham heart study. *Circulation*, 97(18), 1766-1772.
- Okamura, K., Dummer, P., Kopp, J., Qiu, L., Levi, M., Faubel, S., et al. (2013). Endocytosis of albumin by podocytes elicits an inflammatory response and induces apoptotic cell death. *PloS One*, 8(1), e54817.
- Oltean, S., Qiu, Y., Ferguson, J. K., Stevens, M., Neal, C., Russell, A., et al. (2015). Vascular endothelial growth factor-A165b is protective and restores endothelial glycocalyx in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 26(8), 1889-1904.
- Paggetti, J., Haderk, F., Seiffert, M., Janji, B., Distler, U., Ammerlaan, W., et al. (2015). Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood*, 126(9), 1106-1117.

- Palmer, B. F. (2001). Impaired renal autoregulation: Implications for the genesis of hypertension and hypertension-induced renal injury. *The American Journal of the Medical Sciences*, 321(6), 388-400.
- Park, J. B., & Schiffrin, E. L. (2001). Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *Journal of Hypertension*, 19(5), 921-930.
- Parving, H. H., Lehnert, H., Brochner-Mortensen, J., Gomis, R., Andersen, S., Arner, P., et al. (2001). The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 345(12), 870-878.
- Pascual, J. M., Rodilla, E., Costa, J. A., Garcia-Esrich, M., Gonzalez, C., & Redon, J. (2014). Prognostic value of microalbuminuria during antihypertensive treatment in essential hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 64(6), 1228-1234.
- Patari, A., Forsblom, C., Havana, M., Taipale, H., Groop, P. H., & Holthofer, H. (2003). Nephropathy in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes*, 52(12), 2969-2974.
- Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., et al. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18(6), 883-891.
- Perez-Hernandez, J., Forner, M. J., Pinto, C., Chaves, F. J., Cortes, R., & Redon, J. (2015). Increased urinary exosomal MicroRNAs in patients with systemic lupus erythematosus. *PloS One*, 10(9), e0138618.
- Perez-Hernandez, J., Olivares, M. D., Forner, M. J., Chaves, F. J., Cortes, R., & Redon, J. (2016). Urinary dedifferentiated podocytes as a non-invasive biomarker of lupus nephritis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 31(5), 780-789.
- Perico, L., Conti, S., Benigni, A., & Remuzzi, G. (2016). Podocyte-actin dynamics in health and disease. *Nature Reviews.Nephrology*, 12(11), 692-710.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Preston, R. A., Jy, W., Jimenez, J. J., Mauro, L. M., Horstman, L. L., Valle, M., et al. (2003). Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 41(2), 211-217.
- Puelles, V. G., Cullen-McEwen, L. A., Taylor, G. E., Li, J., Hughson, M. D., Kerr, P. G., et al. (2016). Human podocyte depletion in association with older age and hypertension. *American Journal of Physiology.Renal Physiology*, 310(7), F656-F668.
- Qiu, M., Shen, W., Song, X., Ju, L., Tong, W., Wang, H., et al. (2015). Effects of prediabetes mellitus alone or plus hypertension on subsequent occurrence of cardiovascular disease and diabetes mellitus: Longitudinal study. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 65(3), 525-530.

- Quackenbush, J. (2002). Microarray data normalization and transformation. *Nature Genetics*, 32 Suppl, 496-501.
- Rabelink, T. J., & de Zeeuw, D. (2015). The glycocalyx--linking albuminuria with renal and cardiovascular disease. *Nature Reviews.Nephrology*, 11(11), 667-676.
- Ramachandran, K., Saikumar, J., Bijol, V., Koyner, J. L., Qian, J., Betensky, R. A., et al. (2013). Human miRNome profiling identifies microRNAs differentially present in the urine after kidney injury. *Clinical Chemistry*, 59(12), 1742-1752.
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, 200(4), 373-383.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., et al. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20(5), 847-856.
- Redon, J. (2005). Urinary albumin excretion: Lowering the threshold of risk in hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 46(1), 19-20.
- Redon, J., Oliva, M. R., Tormos, C., Giner, V., Chaves, J., Iradi, A., et al. (2003). Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 41(5), 1096-1101.
- Redon, J., & Pascual, J. M. (2006). Development of microalbuminuria in essential hypertension. *Current Hypertension Reports*, 8(2), 171-177.
- Reiser, J., Polu, K. R., Moller, C. C., Kenlan, P., Altintas, M. M., Wei, C., et al. (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nature Genetics*, 37(7), 739-744.
- Rickham, P. P. (1964). Human experimentation. code of ethics of the world medical association. declaration of helsinki. *British Medical Journal*, 2(5402), 177.
- Riehle, M., Buscher, A. K., Gohlke, B. O., Kassmann, M., Kolatsi-Joannou, M., Brasen, J. H., et al. (2016). TRPC6 G757D loss-of-function mutation associates with FSGS. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 27(9), 2771-2783.
- Roberts, T. C., Coenen-Stass, A. M., & Wood, M. J. (2014). Assessment of RT-qPCR normalization strategies for accurate quantification of extracellular microRNAs in murine serum. *PloS One*, 9(2), e89237.
- Robins, R., Baldwin, C., Aoudjit, L., Cote, J. F., Gupta, I. R., & Takano, T. (2017). Rac1 activation in podocytes induces the spectrum of nephrotic syndrome. *Kidney International*, 92(2), 349-364.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(1), 139-140.

- Rocchini, A. P., Key, J., Bondie, D., Chico, R., Moorehead, C., Katch, V., et al. (1989). The effect of weight loss on the sensitivity of blood pressure to sodium in obese adolescents. *The New England Journal of Medicine*, 321(9), 580-585.
- Romaine, S. P., Charchar, F. J., Samani, N. J., & Tomaszewski, M. (2016). Circulating microRNAs and hypertension-from new insights into blood pressure regulation to biomarkers of cardiovascular risk. *Current Opinion in Pharmacology*, 27, 1-7.
- Rose, J. A., Wanner, N., Cheong, H. I., Queisser, K., Barrett, P., Park, M., et al. (2016). Flow cytometric quantification of peripheral blood cell beta-adrenergic receptor density and urinary endothelial cell-derived microparticles in pulmonary arterial hypertension. *PloS One*, 11(6), e0156940.
- Rovira, J., Diekmann, F., Campistol, J. M., & Ramirez-Bajo, M. J. (2017). Therapeutic application of extracellular vesicles in acute and chronic renal injury. [Uso terapeutico de las vesiculas extracelulares en insuficiencia renal aguda y cronica] *Nefrologia : Publicacion Oficial De La Sociedad Espanola Nefrologia*, 37(2), 126-137.
- Royo, F., Schlangen, K., Palomo, L., Gonzalez, E., Conde-Vancells, J., Berisa, A., et al. (2013). Transcriptome of extracellular vesicles released by hepatocytes. *PloS One*, 8(7), e68693.
- Ruggenenti, P., Perna, A., Remuzzi, G., & Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia. (2001). ACE inhibitors to prevent end-stage renal disease: When to start and why possibly never to stop: A post hoc analysis of the REIN trial results. ramipril efficacy in nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 12(12), 2832-2837.
- Ruilope, L. M., Salvetti, A., Jamerson, K., Hansson, L., Warnold, I., Wedel, H., et al. (2001). Renal function and intensive lowering of blood pressure in hypertensive participants of the hypertension optimal treatment (HOT) study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 12(2), 218-225.
- Ruiz-Hurtado, G., Condezo-Hoyos, L., Pulido-Olmo, H., Aranguiz, I., Del Carmen Gonzalez, M., Arribas, S., et al. (2014). Development of albuminuria and enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression. *Journal of Hypertension*, 32(10), 2082-91; discussion 2091.
- Rumantir, M. S., Jennings, G. L., Lambert, G. W., Kaye, D. M., Seals, D. R., & Esler, M. D. (2000). The 'adrenaline hypothesis' of hypertension revisited: Evidence for adrenaline release from the heart of patients with essential hypertension. *Journal of Hypertension*, 18(6), 717-723.
- Sai Lakshmi, S., & Agrawal, S. (2008). piRNABank: A web resource on classified and clustered piwi-interacting RNAs. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue), D173-7.
- Santovito, D., Mandolini, C., Marcantonio, P., De Nardis, V., Bucci, M., Paganelli, C., et al. (2013). Overexpression of microRNA-145 in atherosclerotic plaques from hypertensive patients. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17(3), 217-223.
- Satchell, S. (2013). The role of the glomerular endothelium in albumin handling. *Nature Reviews.Nephrology*, 9(12), 717-725.

- Satchell, S. C., Anderson, K. L., & Mathieson, P. W. (2004). Angiopoietin 1 and vascular endothelial growth factor modulate human glomerular endothelial cell barrier properties. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 15(3), 566-574.
- Satchell, S. C., & Braet, F. (2009). Glomerular endothelial cell fenestrations: An integral component of the glomerular filtration barrier. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 296(5), F947-56.
- Sato, Y., Wharram, B. L., Lee, S. K., Wickman, L., Goyal, M., Venkatareddy, M., et al. (2009). Urine podocyte mRNAs mark progression of renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(5), 1041-1052.
- Schiessl, I. M., Hammer, A., Kattler, V., Gess, B., Theilig, F., Witzgall, R., et al. (2016). Intravital imaging reveals angiotensin II-induced transcytosis of albumin by podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 27(3), 731-744.
- Schiffer, M., Bitzer, M., Roberts, I. S., Kopp, J. B., ten Dijke, P., Mundel, P., et al. (2001). Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(6), 807-816.
- Schlondorff, D., & Banas, B. (2009). The mesangial cell revisited: No cell is an island. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(6), 1179-1187.
- Schulte, C., Molz, S., Appelbaum, S., Karakas, M., Ojeda, F., Lau, D. M., et al. (2015). miRNA-197 and miRNA-223 predict cardiovascular death in a cohort of patients with symptomatic coronary artery disease. *PloS One*, 10(12), e0145930.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., & Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2), 199-208.
- Scott, R. P., & Quaggin, S. E. (2015). Review series: The cell biology of renal filtration. *The Journal of Cell Biology*, 209(2), 199-210.
- Seccia, T. M., Caroccia, B., & Calo, L. A. (2017). Hypertensive nephropathy. moving from classic to emerging pathogenetic mechanisms. *Journal of Hypertension*, 35(2), 205-212.
- Sethupathy, P., Borel, C., Gagnebin, M., Grant, G. R., Deutsch, S., Elton, T. S., et al. (2007). Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: A mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *American Journal of Human Genetics*, 81(2), 405-413.
- Shell, S., Park, S. M., Radjabi, A. R., Schickel, R., Kistner, E. O., Jewell, D. A., et al. (2007). Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), 11400-11405.
- Shih, N. Y., Li, J., Karpitskii, V., Nguyen, A., Dustin, M. L., Kanagawa, O., et al. (1999). Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5438), 312-315.

- Shore, S., Henderson, J. M., Lebedev, A., Salcedo, M. P., Zon, G., McCaffrey, A. P., et al. (2016). Small RNA library preparation method for next-generation sequencing using chemical modifications to prevent adapter dimer formation. *PloS One*, 11(11), e0167009.
- Simons, M., & Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4), 575-581.
- Simpson, K., Wonnacott, A., Fraser, D. J., & Bowen, T. (2016). MicroRNAs in diabetic nephropathy: From biomarkers to therapy. *Current Diabetes Reports*, 16(3), 35-016-0724-8.
- Sison, K., Eremina, V., Baelde, H., Min, W., Hirashima, M., Fantus, I. G., et al. (2010). Glomerular structure and function require paracrine, not autocrine, VEGF-VEGFR-2 signaling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21(10), 1691-1701.
- Soda, K., Balkin, D. M., Ferguson, S. M., Paradise, S., Milosevic, I., Giovedi, S., et al. (2012). Role of dynamin, synaptojanin, and endophilin in podocyte foot processes. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(12), 4401-4411.
- Sofue, T., Kiyomoto, H., Kobori, H., Urushihara, M., Nishijima, Y., Kaifu, K., et al. (2012). Early treatment with olmesartan prevents juxtamedullary glomerular podocyte injury and the onset of microalbuminuria in type 2 diabetic rats. *American Journal of Hypertension*, 25(5), 604-611.
- Sole, C., Cortes-Hernandez, J., Felip, M. L., Vidal, M., & Ordi-Ros, J. (2015). miR-29c in urinary exosomes as predictor of early renal fibrosis in lupus nephritis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 30(9), 1488-1496.
- Sowers, J. R., Epstein, M., & Frohlich, E. D. (2001). Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: An update. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 37(4), 1053-1059.
- Sparks, M. A., Crowley, S. D., Gurley, S. B., Mirotsoy, M., & Coffman, T. M. (2014). Classical renin-angiotensin system in kidney physiology. *Comprehensive Physiology*, 4(3), 1201-1228.
- Stamler, J., Vaccaro, O., Neaton, J. D., & Wentworth, D. (1993). Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the multiple risk factor intervention trial. *Diabetes Care*, 16(2), 434-444.
- Stehouwer, C. D., Henry, R. M., Dekker, J. M., Nijpels, G., Heine, R. J., & Bouter, L. M. (2004). Microalbuminuria is associated with impaired brachial artery, flow-mediated vasodilation in elderly individuals without and with diabetes: Further evidence for a link between microalbuminuria and endothelial dysfunction--the hoorn study. *Kidney International. Supplement*, (92)(92), S42-4.
- Stevens, P. E., Levin, A., & Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members (KDIGO guidelines). (2013). Evaluation and management of chronic kidney disease: Synopsis of the kidney disease: Improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Annals of Internal Medicine*, 158(11), 825-830.

- Sun, Y. B., Qu, X., Zhang, X., Caruana, G., Bertram, J. F., & Li, J. (2013). Glomerular endothelial cell injury and damage precedes that of podocytes in adriamycin-induced nephropathy. *PloS One*, 8(1), e55027.
- Topham, P. S., Haydar, S. A., Kuphal, R., Lightfoot, J. D., & Salant, D. J. (1999). Complement-mediated injury reversibly disrupts glomerular epithelial cell actin microfilaments and focal adhesions. *Kidney International*, 55(5), 1763-1775.
- Topper, J. N., & Gimbrone, M. A., Jr. (1999). Blood flow and vascular gene expression: Fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Molecular Medicine Today*, 5(1), 40-46.
- Tozawa, M., Iseki, K., Iseki, C., Kinjo, K., Ikemiya, Y., & Takishita, S. (2003). Blood pressure predicts risk of developing end-stage renal disease in men and women. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 41(6), 1341-1345.
- Tsioufis, C., Dimitriadis, K., Antoniadis, D., Stefanadis, C., & Kallikazaros, I. (2004). Interrelationships of microalbuminuria with the other surrogates of the atherosclerotic cardiovascular disease in hypertensive subjects. *American Journal of Hypertension*, 17(5 Pt 1), 470-476.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J., & Lotvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654-659.
- van Balkom, B. W., Eisele, A. S., Pegtel, D. M., Bervoets, S., & Verhaar, M. C. (2015). Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 26760.
- van Balkom, B. W., Pisitkun, T., Verhaar, M. C., & Knepper, M. A. (2011). Exosomes and the kidney: Prospects for diagnosis and therapy of renal diseases. *Kidney International*, 80(11), 1138-1145.
- van Eijndhoven, M. A., Zijlstra, J. M., Groenewegen, N. J., Drees, E. E., van Niele, S., Baglio, S. R., et al. (2016). Plasma vesicle miRNAs for therapy response monitoring in hodgkin lymphoma patients. *JCI Insight*, 1(19), e89631.
- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., & Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature Cell Biology*, 13(4), 423-433.
- Villarroya-Beltri, C., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Cabo, F., Perez-Hernandez, D., Vazquez, J., Martin-Cofreces, N., et al. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications*, 4, 2980.
- Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012). Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1820(7), 940-948.

- Vogelmann, S. U., Nelson, W. J., Myers, B. D., & Lemley, K. V. (2003). Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *American Journal of Physiology.Renal Physiology*, 285(1), F40-8.
- Wagner, J., Riwanto, M., Besler, C., Knau, A., Fichtlscherer, S., Rixe, T., et al. (2013). Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(6), 1392-1400.
- Wang, B., Herman-Edelstein, M., Koh, P., Burns, W., Jandeleit-Dahm, K., Watson, A., et al. (2010). E-cadherin expression is regulated by miR-192/215 by a mechanism that is independent of the profibrotic effects of transforming growth factor-beta. *Diabetes*, 59(7), 1794-1802.
- Wang, G., Lai, F. M., Lai, K. B., Chow, K. M., Kwan, B. C., Li, K. T., et al. (2010). Intra-renal and urinary mRNA expression of podocyte-associated molecules for the estimation of glomerular podocyte loss. *Renal Failure*, 32(3), 372-379.
- Wang, G., Lai, F. M., Lai, K. B., Chow, K. M., Kwan, B. C., Li, P. K., et al. (2008). Urinary messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in patients with diabetic nephropathy treated by angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor blocker. *European Journal of Endocrinology*, 158(3), 317-322.
- Wang, G., Lai, F. M., Lai, K. B., Chow, K. M., Li, K. T., & Szeto, C. C. (2007). Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in the urinary sediment of patients with diabetic nephropathy. *Nephron.Clinical Practice*, 106(4), c169-79.
- Waters, A. M., Wu, M. Y., Huang, Y. W., Liu, G. Y., Holmyard, D., Onay, T., et al. (2012). Notch promotes dynamin-dependent endocytosis of nephrin. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 23(1), 27-35.
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., et al. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733-1741.
- Welsch, T., Endlich, N., Gokce, G., Doroshenko, E., Simpson, J. C., Kriz, W., et al. (2005). Association of CD2AP with dynamic actin on vesicles in podocytes. *American Journal of Physiology.Renal Physiology*, 289(5), F1134-43.
- Wharram, B. L., Goyal, M., Wiggins, J. E., Sanden, S. K., Hussain, S., Filipiak, W. E., et al. (2005). Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: Diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 16(10), 2941-2952.
- Williams, Z., Ben-Dov, I. Z., Elias, R., Mihailovic, A., Brown, M., Rosenwaks, Z., et al. (2013). Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(11), 4255-4260.
- Witwer, K. W. (2015). Circulating microRNA biomarker studies: Pitfalls and potential solutions. *Clinical Chemistry*, 61(1), 56-63.

- Wolf, G., Chen, S., & Ziyadeh, F. N. (2005). From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: Podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 54(6), 1626-1634.
- Xie, J. X., Fan, X., Drummond, C. A., Majumder, R., Xie, Y., Chen, T., et al. (2017). MicroRNA profiling in kidney disease: Plasma versus plasma-derived exosomes. *Gene*, 627, 1-8.
- Xu, J., Zhao, J., Evan, G., Xiao, C., Cheng, Y., & Xiao, J. (2012). Circulating microRNAs: Novel biomarkers for cardiovascular diseases. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 90(8), 865-875.
- Yanagida-Asanuma, E., Asanuma, K., Kim, K., Donnelly, M., Young Choi, H., Hyung Chang, J., et al. (2007). Synaptopodin protects against proteinuria by disrupting Cdc42:IRSp53:Mena signaling complexes in kidney podocytes. *The American Journal of Pathology*, 171(2), 415-427.
- Yanez-Mo, M., Siljander, P. R., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borrás, F. E., Buzas, E. I., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 27066.
- Yang, Q., Jia, C., Wang, P., Xiong, M., Cui, J., Li, L., et al. (2014). MicroRNA-505 identified from patients with essential hypertension impairs endothelial cell migration and tube formation. *International Journal of Cardiology*, 177(3), 925-934.
- Yang, Z., von Ballmoos, M. W., Faessler, D., Voelzmann, J., Ortmann, J., Diehm, N., et al. (2010). Paracrine factors secreted by endothelial progenitor cells prevent oxidative stress-induced apoptosis of mature endothelial cells. *Atherosclerosis*, 211(1), 103-109.
- Yoshida, S., Nagase, M., Shibata, S., & Fujita, T. (2008). Podocyte injury induced by albumin overload in vivo and in vitro: Involvement of TGF-beta and p38 MAPK. *Nephron. Experimental Nephrology*, 108(3), e57-68.
- Yuen, D. A., Stead, B. E., Zhang, Y., White, K. E., Kabir, M. G., Thai, K., et al. (2012). eNOS deficiency predisposes podocytes to injury in diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 23(11), 1810-1823.
- Zampetaki, A., Willeit, P., Tilling, L., Drozdov, I., Prokopi, M., Renard, J. M., et al. (2012). Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(4), 290-299.
- Zanchi, C., Macconi, D., Trionfini, P., Tomasoni, S., Rottoli, D., Locatelli, M., et al. (2017). MicroRNA-184 is a downstream effector of albuminuria driving renal fibrosis in rats with diabetic nephropathy. *Diabetologia*, 60(6), 1114-1125.
- Zhao, Y., Li, H., Fang, S., Kang, Y., Wu, W., Hao, Y., et al. (2016). NONCODE 2016: An informative and valuable data source of long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D203-8.

- Zhao, Y., Yin, Z., Li, H., Fan, J., Yang, S., Chen, C., et al. (2017). MiR-30c protects diabetic nephropathy by suppressing epithelial-to-mesenchymal transition in db/db mice. *Aging Cell*, 16(2), 387-400.
- Zheng, Z., Guan, M., Jia, Y., Wang, D., Pang, R., Lv, F., et al. (2016). The coordinated roles of miR-26a and miR-30c in regulating TGFbeta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in diabetic nephropathy. *Scientific Reports*, 6, 37492.
- Zhou, H., Kajiyama, H., Tsuji, T., Hu, X., Leelahavanichkul, A., Vento, S., et al. (2013). Urinary exosomal wilms' tumor-1 as a potential biomarker for podocyte injury. *American Journal of Physiology.Renal Physiology*, 305(4), F553-9.
- Zhou, Y., Fang, L., Yu, Y., Niu, J., Jiang, L., Cao, H., et al. (2016). Erythropoietin protects the tubular basement membrane by promoting the bone marrow to release extracellular vesicles containing tPA-targeting miR-144. *American Journal of Physiology.Renal Physiology*, 310(1), F27-40.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 1. Listado de miARNs diferencialmente expresados al comparar MALB vs NO MALB dentro de cada una de las fracciones estudiadas por separado (Plasma, Exosomas de Plasma y Exosomas de Orina).

PLASMA				EXO PLASMA				EXO ORINA			
MICRO ARN	LOG2 (FC)	P VALOR	FDR	MICRO ARN	LOG2 (FC)	P VALOR	FDR	MICRO ARN	LOG2 (FC)	P VALOR	FDR
hsa-miR-374a-5p	2,58	2,71E-05	0,0164	hsa-let-7e-5p	4,85	1,38E-05	0,0056	hsa-let-7e-5p	0,88	0,0028	0,4881
hsa-miR-664a-3p	2,76	0,0002	0,0701	hsa-miR-23b-3p	6,07	6,28E-05	0,0110	hsa-miR-934	5,47	0,0048	0,4881
hsa-miR-23b-3p	1,85	0,0006	0,1165	hsa-miR-142-5p	4,28	0,0001	0,0110	hsa-miR-146a-5p	-1,35	0,0081	0,4881
hsa-miR-376c-3p	2,62	0,0011	0,1509	hsa-let-7d-5p	3,25	0,0003	0,0300	hsa-miR-26a-5p	-2,02	0,0086	0,4881
hsa-miR-486-5p	1,56	0,0015	0,1509	hsa-let-7d-3p	4,06	0,0004	0,0300	hsa-miR-7706	3,57	0,0122	0,5549
hsa-miR-154-3p	2,62	0,0015	0,1509	hsa-miR-654-3p	3,64	0,0005	0,0309	hsa-miR-143-3p	2,06	0,0336	0,9795
hsa-miR-654-3p	1,90	0,0022	0,1611	hsa-let-7g-5p	2,87	0,0007	0,0419	hsa-miR-99b-5p	0,76	0,0364	0,9795
hsa-miR-320a	1,07	0,0025	0,1611	hsa-miR-126-3p	3,85	0,0013	0,0672	hsa-miR-92b-3p	0,68	0,0467	0,9795
hsa-miR-5584-5p	2,21	0,0027	0,1611	hsa-miR-375	-3,28	0,0019	0,0716				
hsa-miR-486-3p	2,34	0,0027	0,1611	hsa-miR-200b-3p	-6,51	0,0019	0,0716				
hsa-miR-93-5p	1,14	0,0029	0,1611	hsa-miR-126-5p	3,19	0,0021	0,0716				
hsa-miR-106b-3p	1,35	0,0041	0,1906	hsa-miR-26b-5p	2,39	0,0021	0,0716				
hsa-miR-6825-5p	1,61	0,0044	0,1906	hsa-miR-222-3p	-2,16	0,0023	0,0720				
hsa-let-7a-5p	1,77	0,0047	0,1906	hsa-miR-31-5p	-5,53	0,0051	0,1473				
hsa-miR-5090	1,60	0,0047	0,1906	hsa-miR-223-3p	3,44	0,0070	0,1701				
hsa-miR-411-3p	1,92	0,0053	0,1906	hsa-miR-191-5p	2,09	0,0071	0,1701				
hsa-miR-939-5p	0,93	0,0053	0,1906	hsa-let-7f-5p	1,89	0,0074	0,1701				
hsa-miR-1260b	2,55	0,0061	0,1948	hsa-miR-409-5p	-3,97	0,0083	0,1701				
hsa-miR-19a-3p	1,43	0,0061	0,1948	hsa-miR-125b-2-3p	-3,44	0,0090	0,1701				
hsa-let-7b-5p	0,88	0,0065	0,1980	hsa-miR-144-3p	4,42	0,0090	0,1701				
hsa-miR-548e-3p	2,36	0,0094	0,2553	hsa-miR-23a-3p	2,72	0,0090	0,1701				
hsa-miR-301a-3p	1,26	0,0097	0,2553	hsa-miR-363-3p	4,13	0,0096	0,1701				
hsa-miR-493-5p	1,11	0,0103	0,2553	hsa-miR-7-5p	-3,55	0,0096	0,1701				
hsa-let-7e-5p	1,25	0,0118	0,2553	hsa-miR-340-5p	-1,89	0,0104	0,1758				
hsa-miR-539-5p	1,46	0,0122	0,2553	hsa-miR-30e-3p	-2,01	0,0116	0,1850				
hsa-miR-5187-5p	1,05	0,0128	0,2553	hsa-miR-381-3p	-2,36	0,0118	0,1850				
hsa-miR-1307-3p	1,09	0,0129	0,2553	hsa-let-7b-5p	1,60	0,0125	0,1878				
hsa-let-7c-5p	0,63	0,0129	0,2553	hsa-miR-30a-5p	-2,57	0,0136	0,1984				
hsa-miR-6758-5p	1,73	0,0130	0,2553	hsa-miR-539-3p	-3,29	0,0152	0,1991				
hsa-miR-151a-5p	1,34	0,0131	0,2553	hsa-miR-200a-3p	-3,48	0,0152	0,1991				
hsa-let-7i-5p	0,94	0,0140	0,2553	hsa-miR-423-5p	1,84	0,0161	0,1991				
hsa-miR-224-5p	1,67	0,0140	0,2553	hsa-miR-151a-3p	2,02	0,0164	0,1991				
hsa-miR-4446-3p	1,25	0,0143	0,2553	hsa-miR-181a-2-3p	-2,18	0,0165	0,1991				
hsa-let-7d-5p	0,92	0,0143	0,2553	hsa-miR-425-5p	1,80	0,0169	0,1991				
hsa-miR-500a-3p	-1,27	0,0163	0,2739	hsa-miR-26a-5p	-1,82	0,0171	0,1991				
hsa-miR-3161	2,26	0,0163	0,2739	hsa-miR-148b-5p	-2,35	0,0181	0,2040				
hsa-miR-744-5p	0,94	0,0182	0,2876	hsa-miR-140-5p	-2,15	0,0185	0,2040				
hsa-miR-200c-3p	0,89	0,0185	0,2876	hsa-miR-99b-3p	-3,51	0,0192	0,2055				
hsa-miR-199a-3p	1,68	0,0188	0,2876	hsa-miR-6837-3p	-4,24	0,0200	0,2066				
hsa-miR-6516-5p	1,27	0,0192	0,2876	hsa-miR-190b	-3,09	0,0212	0,2066				
hsa-miR-3605-5p	1,11	0,0195	0,2876	hsa-miR-141-3p	-3,02	0,0217	0,2066				
hsa-miR-221-5p	-1,12	0,0199	0,2876	hsa-miR-107	-1,70	0,0217	0,2066				
hsa-let-7f-5p	0,86	0,0217	0,3000	hsa-miR-6852-5p	-2,28	0,0218	0,2066				
hsa-miR-28-5p	1,27	0,0224	0,3000	hsa-miR-194-5p	-4,57	0,0231	0,2137				
hsa-miR-99b-5p	0,99	0,0225	0,3000	hsa-miR-504-5p	-3,60	0,0244	0,2207				
hsa-miR-3138	1,09	0,0234	0,3000	hsa-miR-203a-3p	-3,18	0,0252	0,2231				
hsa-miR-628-5p	1,44	0,0234	0,3000	hsa-miR-2467-5p	-3,50	0,0261	0,2257				
hsa-miR-27a-3p	0,95	0,0238	0,3000	hsa-miR-1185-2-3p	-2,80	0,0274	0,2323				
hsa-miR-548ax	2,24	0,0247	0,3054	hsa-miR-326	-2,78	0,0281	0,2336				
hsa-miR-126-3p	0,89	0,0260	0,3098	hsa-miR-370-3p	-2,01	0,0307	0,2401				
hsa-miR-337-3p	2,30	0,0261	0,3098	hsa-miR-598-3p	-2,74	0,0317	0,2401				
hsa-miR-4667-5p	1,42	0,0278	0,3242	hsa-miR-1185-1-3p	-2,85	0,0317	0,2401				
hsa-miR-18a-5p	1,34	0,0289	0,3310	hsa-miR-34a-5p	-3,30	0,0319	0,2401				
hsa-miR-651-5p	1,54	0,0297	0,3335	hsa-miR-30a-3p	-3,00	0,0322	0,2401				
hsa-miR-1307-5p	-0,77	0,0314	0,3426	hsa-miR-204-5p	-3,62	0,0333	0,2401				
hsa-miR-195-5p	1,30	0,0321	0,3426	hsa-miR-452-5p	-3,13	0,0344	0,2401				
hsa-let-7g-5p	0,72	0,0322	0,3426	hsa-miR-98-3p	-2,50	0,0346	0,2401				
hsa-miR-758-3p	-0,92	0,0328	0,3426	hsa-miR-103a-3p	-3,13	0,0347	0,2401				
hsa-miR-889-3p	0,89	0,0334	0,3426	hsa-miR-122-5p	2,82	0,0348	0,2401				
hsa-miR-3143	-1,44	0,0339	0,3426	hsa-miR-191-3p	-2,35	0,0384	0,2535				
hsa-miR-4775	1,39	0,0353	0,3496	hsa-miR-140-3p	-1,40	0,0386	0,2535				
hsa-miR-3176	-1,31	0,0379	0,3496	hsa-miR-656-3p	-3,28	0,0391	0,2535				
hsa-miR-98-5p	0,80	0,0384	0,3496	hsa-miR-3613-5p	-2,66	0,0392	0,2535				
hsa-miR-4511	1,30	0,0386	0,3496	hsa-miR-199b-5p	-2,91	0,0417	0,2604				
hsa-miR-548l	0,73	0,0386	0,3496	hsa-miR-429	-4,21	0,0424	0,2604				
hsa-miR-4796-5p	-1,90	0,0389	0,3496	hsa-miR-412-5p	-3,38	0,0432	0,2604				
hsa-miR-556-5p	1,44	0,0391	0,3496	hsa-miR-337-5p	-3,12	0,0438	0,2604				
hsa-miR-625-5p	1,32	0,0401	0,3496	hsa-miR-500a-3p	-3,13	0,0440	0,2604				
hsa-miR-32-3p	0,90	0,0409	0,3496	hsa-miR-1270	-2,83	0,0441	0,2604				
hsa-miR-6513-3p	1,28	0,0409	0,3496	hsa-miR-627-5p	2,62	0,0472	0,2685				
hsa-miR-2116-3p	-1,88	0,0410	0,3496	hsa-miR-1306-3p	-3,00	0,0474	0,2685				
hsa-miR-3154	0,97	0,0421	0,3547	hsa-miR-92a-1-5p	-2,91	0,0487	0,2685				
hsa-miR-99b-3p	1,09	0,0455	0,3760	hsa-miR-6816-3p	-2,76	0,0489	0,2685				
hsa-miR-664a-5p	0,87	0,0459	0,3760	hsa-miR-345-5p	-1,56	0,0492	0,2685				
hsa-miR-136-3p	-1,01	0,0468	0,3780	hsa-miR-99a-5p	-2,01	0,0495	0,2685				
hsa-miR-4781-3p	1,87	0,0499	0,3953								

(continúa)

hsa-miR-4701-3p	-1,27	0,0303	0,1875								
hsa-miR-374a-3p	1,05	0,0306	0,1875								
hsa-miR-548ax	-1,61	0,0308	0,1875								
hsa-miR-4746-5p	1,19	0,0313	0,1880								
hsa-miR-320b	-1,09	0,0324	0,1922								
hsa-miR-363-3p	-1,36	0,0336	0,1942								
hsa-miR-92a-1-5p	-1,16	0,0338	0,1942								
hsa-miR-148b-3p	0,75	0,0338	0,1942								
hsa-miR-151b	-1,31	0,0343	0,1949								
hsa-let-7e-3p	1,77	0,0348	0,1957								
hsa-miR-4429	-1,02	0,0354	0,1971								
hsa-miR-3187-3p	-1,48	0,0364	0,2003								
hsa-miR-642a-5p	-1,50	0,0376	0,2047								
hsa-miR-548l	-1,16	0,0387	0,2074								
hsa-miR-98-3p	1,46	0,0389	0,2074								
hsa-miR-3190-3p	-1,52	0,0395	0,2084								
hsa-miR-30c-2-3p	-2,62	0,0402	0,2095								
hsa-miR-6767-5p	-3,09	0,0412	0,2095								
hsa-miR-651-5p	1,33	0,0413	0,2095								
hsa-miR-223-5p	-0,91	0,0413	0,2095								
hsa-miR-532-5p	0,87	0,0432	0,2166								
hsa-miR-342-5p	-0,79	0,0447	0,2223								
hsa-miR-26a-5p	0,76	0,0455	0,2243								
hsa-miR-542-3p	1,18	0,0473	0,2299								
hsa-miR-196a-5p	-1,93	0,0476	0,2299								
hsa-miR-3605-5p	-1,22	0,0493	0,2361								

Tabla 2. Listado de miARNs diferencialmente expresados al comparar Plasma vs Exosomas de orina en 1) Todos los pacientes, 2) Grupo MALB y 3) Grupo NO MALB.

Log Fold change (logFC) > 0 indica mayor cantidad en biofluido Plasma; Log Fold change (logFC) < 0 indica mayor cantidad en biofluido Exosomas de orina.

TOTAL PACIENTES				GRUPO MALB				GRUPO NO MALB			
MICRO ARN	LOG2 (FC)	P VALOR	FDR	MICRO ARN	LOG2 (FC)	P VALOR	FDR	MICRO ARN	LOG2 (FC)	P VALOR	FDR
hsa-miR-27a-3p	-1,22	0,0007	0,2231	hsa-miR-335-5p	2,55	0,0008	0,3957	hsa-miR-98-3p	-3,99	0,0001	0,0563
hsa-miR-208b-3p	3,54	0,0018	0,2231	hsa-miR-196a-5p	4,92	0,0021	0,5143	hsa-miR-376c-3p	-3,45	0,0036	0,5998
hsa-miR-376c-3p	-2,86	0,0018	0,2231	hsa-miR-19a-3p	1,82	0,0089	1,0000	hsa-miR-363-3p	1,18	0,0051	0,5998
hsa-miR-3168	-2,61	0,0018	0,2231	hsa-miR-542-3p	2,93	0,0143	1,0000	hsa-miR-30b-3p	-1,35	0,0091	0,5998
hsa-miR-532-5p	1,28	0,0034	0,3307	hsa-miR-6861-5p	-2,50	0,0278	1,0000	hsa-miR-320a	-1,17	0,0095	0,5998
hsa-let-7a-5p	-1,33	0,0058	0,3580	hsa-miR-200a-5p	4,67	0,0304	1,0000	hsa-miR-224-5p	-2,54	0,0108	0,5998
hsa-miR-744-5p	-1,06	0,0059	0,3580	hsa-miR-429	2,93	0,0316	1,0000	hsa-miR-199a-3p	-2,26	0,0109	0,5998
hsa-miR-487b-3p	-1,75	0,0059	0,3580	hsa-miR-6812-3p	2,13	0,0356	1,0000	hsa-miR-375	2,43	0,0112	0,5998
hsa-miR-92a-3p	1,23	0,0091	0,4880	hsa-miR-455-3p	4,57	0,0364	1,0000	hsa-miR-28-5p	-1,53	0,0115	0,5998
hsa-miR-486-3p	-2,95	0,0153	0,5843	hsa-miR-342-3p	1,74	0,0397	1,0000	hsa-miR-374b-5p	-1,49	0,0123	0,5998
hsa-miR-320a	-0,84	0,0214	0,5843					hsa-miR-592	-3,06	0,0165	0,6260
hsa-miR-3192-5p	-1,85	0,0232	0,5843					hsa-miR-5584-5p	-3,28	0,0190	0,6260
hsa-miR-101-3p	1,34	0,0249	0,5843					hsa-miR-664a-3p	-3,40	0,0221	0,6260
hsa-miR-4746-5p	1,91	0,0250	0,5843					hsa-miR-744-5p	-1,15	0,0221	0,6260
hsa-miR-3614-5p	1,64	0,0260	0,5843					hsa-miR-92a-3p	1,45	0,0227	0,6260
hsa-miR-1185-1-3p	-2,05	0,0262	0,5843					hsa-miR-221-3p	-1,13	0,0248	0,6260
hsa-miR-6514-5p	-1,83	0,0278	0,5843					hsa-miR-93-5p	-1,25	0,0250	0,6260
hsa-miR-374b-5p	-0,98	0,0283	0,5843					hsa-miR-642a-5p	-1,88	0,0252	0,6260
hsa-miR-224-5p	-1,51	0,0290	0,5843					hsa-miR-374b-3p	-2,10	0,0255	0,6260
hsa-miR-190a-5p	1,35	0,0321	0,5843					hsa-miR-27a-3p	-1,22	0,0256	0,6260
hsa-miR-23b-3p	-0,91	0,0337	0,5843					hsa-miR-1185-1-3p	-2,51	0,0352	0,7985
hsa-miR-93-5p	-0,93	0,0341	0,5843					hsa-miR-454-3p	-1,67	0,0363	0,7985
hsa-let-7e-5p	-0,61	0,0345	0,5843					hsa-miR-150-3p	2,46	0,0415	0,7985
hsa-miR-429	1,41	0,0359	0,5843					hsa-miR-183-5p	1,06	0,0418	0,7985
hsa-miR-452-5p	-1,72	0,0363	0,5843					hsa-miR-556-5p	-2,09	0,0435	0,7985
hsa-miR-379-3p	-1,99	0,0370	0,5843								
hsa-miR-627-5p	-1,65	0,0388	0,5843								
hsa-miR-6804-5p	-1,79	0,0393	0,5843								
hsa-miR-3120-3p	-1,89	0,0398	0,5843								
hsa-miR-6758-5p	-1,74	0,0398	0,5843								
hsa-miR-92a-1-5p	-1,35	0,0403	0,5843								
hsa-miR-3190-3p	-1,57	0,0409	0,5843								
hsa-miR-195-3p	-1,72	0,0418	0,5843								
hsa-miR-203a-3p	1,35	0,0443	0,5843								
hsa-let-7d-5p	-0,90	0,0444	0,5843								
hsa-miR-496	-1,75	0,0455	0,5843								
hsa-miR-6855-5p	-1,67	0,0457	0,5843								
hsa-miR-1249-3p	1,85	0,0493	0,5843								
hsa-miR-431-5p	-1,51	0,0494	0,5843								

Tabla 3. Listado de miARNs diferencialmente expresados al comparar Exosomas de plasma vs Exosomas de orina en 1) Todos los pacientes, 2) Grupo MALB y 3) Grupo NO MALB. Log Fold change (logFC) > 0 indica mayor cantidad en biofluido Exosomas de plasma; Log Fold change (logFC) < 0 indica mayor cantidad en biofluido Exosomas de orina.

TOTAL PACIENTES				GRUPO MALB				GRUPO NO MALB			
MICRO ARN	LOG2 (FC)	P VALOR	FDR	MICRO ARN	LOG2 (FC)	P VALOR	FDR	MICRO ARN	LOG2 (FC)	P VALOR	FDR
hsa-let-7d-5p	2,87	7,69E-08	2,21E-05	hsa-miR-151b	3,91	0,0086	0,7768	hsa-miR-25-5p	4,33	0,0004	0,1182
hsa-let-7g-5p	2,60	1,58E-06	0,0002	hsa-miR-451a	-2,94	0,0122	0,7768	hsa-miR-497-5p	5,62	0,0008	0,1293
hsa-let-7e-5p	2,13	2,90E-05	0,0021	hsa-miR-19a-3p	-3,08	0,0124	0,7768	hsa-let-7d-5p	1,95	0,0020	0,1704
hsa-let-7d-3p	2,96	3,40E-05	0,0021	hsa-miR-342-3p	-2,43	0,0167	0,7768	hsa-miR-374a-3p	-2,04	0,0021	0,1704
hsa-miR-208b-3p	-6,06	3,64E-05	0,0021	hsa-miR-17-5p	-2,63	0,0169	0,7768	hsa-miR-627-5p	3,74	0,0033	0,2177
hsa-miR-23b-3p	2,32	0,0005	0,0199	hsa-let-7d-5p	2,27	0,0181	0,7768	hsa-miR-30b-3p	2,90	0,0063	0,3470
hsa-miR-23a-3p	2,24	0,0005	0,0199	hsa-miR-99b-5p	1,74	0,0223	0,8223	hsa-let-7e-5p	2,00	0,0081	0,3470
hsa-miR-151a-3p	1,43	0,0007	0,0250	hsa-miR-23b-3p	2,01	0,0271	0,8726	hsa-let-7g-5p	1,72	0,0089	0,3470
hsa-miR-191-5p	1,43	0,0011	0,0330	hsa-miR-335-5p	-2,94	0,0390	0,8893	hsa-miR-23b-3p	2,59	0,0095	0,3470
hsa-miR-106b-5p	2,90	0,0013	0,0330	hsa-let-7e-5p	1,41	0,0399	0,8893	hsa-miR-363-3p	2,57	0,0122	0,3732
hsa-miR-654-3p	2,99	0,0013	0,0330	hsa-miR-151a-3p	1,25	0,0458	0,8893	hsa-miR-10b-5p	-2,31	0,0124	0,3732
hsa-miR-28-5p	1,77	0,0020	0,0467	hsa-miR-330-5p	-3,03	0,0492	0,8893	hsa-miR-148a-3p	-1,18	0,0169	0,4657
hsa-miR-126-3p	3,67	0,0024	0,0534					hsa-miR-142-5p	2,25	0,0188	0,4777
hsa-miR-92a-3p	-1,52	0,0044	0,0846					hsa-miR-182-5p	-1,37	0,0270	0,5941
hsa-miR-142-5p	2,47	0,0044	0,0846					hsa-miR-28-5p	1,59	0,0270	0,5941
hsa-miR-424-3p	-2,13	0,0055	0,0946					hsa-miR-192-5p	-1,41	0,0329	0,6783
hsa-miR-127-3p	1,80	0,0057	0,0946					hsa-miR-183-5p	-1,43	0,0412	0,7421
hsa-miR-320a	0,79	0,0059	0,0946					hsa-miR-7-1-3p	2,14	0,0427	0,7421
hsa-miR-134-5p	2,99	0,0079	0,1192					hsa-miR-664b-5p	2,76	0,0427	0,7421
hsa-miR-101-3p	-2,08	0,0092	0,1325					hsa-miR-18a-5p	3,26	0,0485	0,7996
hsa-miR-374a-3p	-1,34	0,0105	0,1430								
hsa-miR-486-3p	3,43	0,0114	0,1482								
hsa-miR-126-5p	1,96	0,0140	0,1695								
hsa-let-7b-5p	0,76	0,0142	0,1695								
hsa-miR-497-5p	3,64	0,0153	0,1729								
hsa-miR-363-3p	1,64	0,0157	0,1729								
hsa-miR-144-3p	0,85	0,0190	0,2017								
hsa-miR-493-5p	2,03	0,0220	0,2195								
hsa-miR-146b-3p	-2,05	0,0222	0,2195								
hsa-miR-150-3p	-3,08	0,0242	0,2314								
hsa-miR-140-3p	-1,07	0,0260	0,2408								
hsa-miR-26b-5p	0,90	0,0313	0,2804								
hsa-miR-181b-5p	-1,53	0,0400	0,3475								
hsa-miR-1307-3p	-0,90	0,0428	0,3600								
hsa-miR-425-3p	1,85	0,0439	0,3600								